



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Cátia João Monteiro
da Santa**

**Estudo das alterações do proteoma mitocondrial
associadas à MADD**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Cátia João Monteiro
da Santa**

**Estudo das alterações do proteoma mitocondrial
associadas à MADD**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Francisco Amado e da Professora Doutora Rita Ferreira do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Laura Ferreira Teixeira Vilarinho

Investigadora Principal, Unidade de Rastreio Neonatal - Departamento de Genética,
Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães INSA

Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor associado, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar convidada, Departamento de Química, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de deixar o meu especial agradecimento ao Professor Doutor Francisco Amado e à Professora Doutora Rita Ferreira pela orientação e motivação, indispensáveis para a realização desta dissertação.

Agradeço ainda ao Doutor Rui Vitorino pelos ensinamentos, ajuda e acompanhamento do trabalho laboratorial.

Gostaria ainda de agradecer ao Dr. Hugo Rocha pelo fornecimento das amostras e das muitas respostas às questões que lhe foram colocadas e que foram imprescindíveis para realização deste trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas do Centro de Espectometria de Massa pelo bom ambiente proporcionado no laboratório, amizade e ajuda, e especialmente pela paciência naqueles dias mais difíceis.

A todos os meus amigos pelo apoio, paciência e compreensão, e em especial por aturarem as infindáveis conversas sobre este trabalho.

Por fim, quero deixar um agradecimento à minha família, em especial aos meus pais, minha irmã e avó, pelo apoio incondicional e por me permitirem ser quem sou.

palavras-chave

Oxidação mitocondrial de ácidos gordos; proteoma mitocondrial; MADD; *chaperones*; apoptose.

resumo

A deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenases (MADD) é um dos défices conhecidos da β -oxidação mitocondrial, causado por mutações nos genes que codificam as proteínas ETFDH e ETF ou por alterações ainda não totalmente caracterizadas do metabolismo da riboflavina. Muito embora já se conheçam alguns estudos sobre estes défices da β -oxidação, os mecanismos e alterações subjacentes às variadas manifestações fenotípicas encontram-se ainda pouco conhecidos. De modo a contribuir para uma melhor clarificação dos mecanismos de adaptação celular à MADD, dando particular ênfase à mitocôndria, no estudo realizado no âmbito desta dissertação utilizou-se uma abordagem proteómica baseada na análise electroforética bi-dimensional seguida da identificação das proteínas por espectrometria de massa, da fracção mitocondrial isolada de fibroblastos obtidos de biopsias da pele de dois doentes com MADD do tipo III, um com um défice de ETFDH (Doente 1) e o outro com um défice de ETF (Doente 2). Com esta abordagem experimental foram detectadas 248 proteínas mitocondriais, das quais 28 se encontravam diferentemente expressas no Doente 1 e 33 no Doente 2. De entre estas proteínas diferentemente expressas são de realçar a sobreexpressão de *chaperones*, como a Hsp90 ou a Hsp7C, e de enzimas antioxidantes, como a glutathione S-transferase e superóxido dismutase, e ainda de algumas proteínas ligadas à apoptose, como por exemplo a GAPDH. De um modo geral, este estudo proporciona uma perspectiva global das principais adaptações da mitocôndria nos casos moderados de MADD, revelando as principais vias alteradas através de variações na expressão de enzimas metabólicas, de proteínas responsáveis pela manutenção da homeostasia redox celular, pela qualidade funcional das proteínas mitocondriais e pela apoptose.

keywords

Mitochondrial fatty acid oxidation; mitochondrial proteome; MADD; chaperones; apoptosis.

abstract

The multiple acyl-CoA dehydrogenases deficiency (MADD) is one of the known deficits of the mitochondrial β -oxidation process, caused by mutations in the genes that codify for the ETFDH and ETF proteins or by some not yet totally characterized riboflavin metabolism disturbs. Although there are some studies about these deficits of the β -oxidation, the mechanisms and alterations underlying the several phenotypic manifestations are yet hardly understood. In order to contribute to a better understanding of the cellular adaptation mechanisms to MADD, giving particular emphasis to mitochondria, in this study it was used a proteomic approach based in the bi-dimensional electrophoretic analysis followed by the protein identification by mass spectrometry of the mitochondrial fraction isolated from fibroblasts obtained by skin biopsy of two patients with type III MADD, one with a deficit of ETFDH (Patient 1) and the other with a deficit of ETF (Patient 2). With this experimental approach it was detected 248 mitochondrial proteins, of which 28 were differently expressed in patient 1 and 33 in Patient 2. Among these differently expressed proteins, an overexpression of chaperones, like Hsp90 or Hsp7C, antioxidants enzymes, like glutathione S-transferase and superoxide dismutase (MnSOD), and also of some proteins associated with apoptosis, like GAPDH, was observed. In general, this study provides a global perspective of the main mitochondrial adaptations in two moderate cases of MADD, revealing the main pathways involved, based on the alterations of metabolic enzymes expression and of proteins that regulate cellular homeostasis, protein quality control and apoptosis.

Índice

I - Introdução.....	1
II - Estado da Arte.....	5
1. Oxidação Mitocondrial de Ácidos Gordos (FAO).....	7
1.1. Sistemas Enzimáticos da FAO.....	9
1.2. Organização espacial dos Sistemas Enzimáticos associados à FAO	16
2. Doenças Metabólicas	17
2.1. Défices da Oxidação Mitocondrial de Ácidos Gordos.....	19
2.1.1. Mecanismos genéticos e moleculares subjacentes aos défices da FAO	20
2.1.2. Abordagens utilizadas no diagnóstico dos défices da FAO.....	23
2.2. Deficiência Múltipla de Acil-CoA Desidrogenases (MADD).....	25
III - Objectivos.....	29
IV - Materiais e Métodos.....	33
1. Desenho Experimental	35
2. Caracterização das Amostras.....	36
3. Cultura Celular.....	36
4. Isolamento de Mitocôndrias	37
5. Determinação da Concentração de Proteína total	37
6. Separação das proteínas mitocondriais por electroforese bi-dimensional (2DE)	38
7. Digestão Trípica <i>in-gel</i>	39
8. Análise por Espectrometria de Massa	39
9. <i>Western Blot</i>	40
10. Análise Estatística.....	40
V - Resultados.....	43
1. Caracterização dos casos de MADD analisados.....	45

2. Análise do perfil proteico mitocondrial obtido por 2DE	48
3. Análise da expressão de proteínas mitocondriais por <i>Western Blot</i>	56
VI - Discussão.....	59
VII - Conclusão.....	67
VIII - Referências Bibliográficas	71
IX - Anexos	83
Anexo A.....	85
Anexo B.....	86

Índice de Figuras

Figura 1 - Visão global do processamento dos ácidos gordos numa célula. Adaptado de [1].	8
Figura 2 - Esquematisação do processo da FAO tomando por exemplo o palmitato, em que os passos de 1 a 5 esquematizam os 4 principais passos da β - oxidação e os passos de 6 a 8 representam os processos de obtenção de energia a partir da acetil-CoA. Adaptado de [17].	11
Figura 3 - Representação esquemática da ETF. Na imagem estão representadas as duas subunidades da proteína α (a azul) e a β (a azul lavanda), assim como os três domínios (em numeração romana), a amarelo encontra-se representado o cofactor FAD e a verde o AMP [21].	13
Figura 4 - Representação esquemática da ETFDH. Na imagem estão representados três domínios (FAD (azul), <i>cluster</i> 4Fe4S (vermelho), e domínio de ligação à UQ (verde)), assim como o FAD (amarelo ouro), o <i>cluster</i> 4Fe4S (magenta), e a UQ (vermelho escuro). As α - Hélices e as Folhas- β estão numeradas sequencialmente do terminal amínico para o carboxílico [30].	14
Figura 5 - Esquematisação do hipotético Complexo Enzimático interveniente na via metabólica FAO [13].	17
Figura 6 - Possíveis destinos das proteínas com alteração do <i>folding</i> devido a uma mutação <i>missense</i> no ADN codificante. Adaptado de [6].	22
Figura 7 - Esquema representativo dos vários procedimentos utilizados para as análises bioquímicas realizadas nas amostras obtidas de indivíduos controlo e com MADD.	35
Figura 8 - Sequência de aminoácidos das proteínas ETFDH (A) e ETF, subunidade β (B) segundo a Uniprot (www.uniprot.org). A amarelo é assinalada a alteração de aminoácidos (em A associada à mutação identificada no Doente 1 (p.P534L/p.P534L) e em B à mutação encontrada no Doente 2 (p.R191C/p.R191C). Encontram-se ainda identificadas com rectângulos os elementos estruturais das proteínas, em que a magenta estão as α -hélices, a azul as folha- β e a verde as <i>turn</i> . O segmento a cinza corresponde ao <i>leader peptide</i> da proteína ETFDH, a rosa estão representados os aminoácidos que	

interagem com o FAD, a azul turquesa os de ligação ao *cluster* 4Fe4S, a verde tropa de ligação à UQ e a verde cinza o possível domínio transmembranar da ETFDH [21, 30]. ... 45

Figura 9 - Efeito da mutação p.P534L/p.P534L no gene *ETFDH* na expressão da desidrogenase no Doente 1, avaliada nas fracções mitocondrial, citoplasmática e nuclear. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *Western Blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). *p<0,05 ** p<0,01..... 47

Figura 10 - Efeito da mutação p.R191C/p.R191C no gene *ETF* na expressão da subunidade β da ETF no Doente 2, avaliada nas fracções mitocondrial, citoplasmática e nuclear. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *Western Blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). *p<0,05 ** p<0,01..... 47

Figura 11 - Imagens representativas dos géis obtidos na separação proteica das fracções mitocondriais dos indivíduos Controlo (A), do Doente 1 (B) e do Doente 2 (C) realizada por electroforese bidimensional. A numeração nas imagens indica os *spots* cujas proteínas se encontram diferentemente expressas em cada um dos casos em estudo e tem correspondência na Tabela 3. (na Figura A.1 do Anexo A é apresentada uma ampliação desta figura)..... 48

Figura 12 - Distribuição das proteínas mitocondriais identificadas por 2DE-MS/MS considerando a função biológica atribuída pelo GOA (A) e pelo Panther (B). 50

Figura 13 - Distribuição das proteínas diferentemente expressas por classes atendendo à sua função biológica, com base no GOA. Em A é apresentado o perfil global, em B o do Doente 1 e em C do Doente 2. 55

Figura 14 - Variação da expressão mitocondrial das ETFDH e ETF, subunidade β , avaliada por *western blot* nas fracções mitocondriais dos indivíduos controlo e Doente 1 (para a ETFB) e Doente 2 (para a ETFDH). Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *western blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). *p<0,05 ** p<0,01 57

Figura 15 - Variação da expressão mitocondrial das proteínas subunidade β da ATP sintase e GAPDH avaliada por *western blot* nas amostras dos indivíduos controlo, Doente 1 e Doente 2. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *western blot*. Os

valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). *p<0,05 ** p<0,0158

Figura A-1 - Imagens representativas dos géis obtidos na separação proteica das fracções mitocondriais dos indivíduos Controlo (A), do Doente 1 (B) e do Doente 2 (C) realizada por electroforese bidimensional. A numeração nas imagens indica os *spots* cujas proteínas se encontram diferentemente expressas em cada um dos casos em estudo e tem correspondência na Tabela 3. (Figura ampliada).....85

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Enzimas intervenientes na β -oxidação mitocondrial. Adaptado de [7].	10
Tabela 2 - Resumo dos sintomas, testes bioquímicos e possíveis terapêuticas para os défices da β – oxidação mitocondrial [2].	24
Tabela 3 - Proteínas diferentemente expressas identificadas pela análise comparativa da fracção mitocondrial de cada um dos doentes em estudo com os indivíduos controlo. Os valores assinalados com “+” representam sobreexpressão e com “-“ a subexpressão da proteína relativamente ao controlo. O número do <i>spot</i> tem correspondência na Figura 11.	51
Tabela B-1 - Proteínas totais identificadas por espectometria de massa a partir a partir dos géis 2DE dos indivíduos controlo. Os números dos <i>spot</i> correspondem ao valores que lhes foram atribuídos por altura da sua excisão dos géis.	86

Lista de Acrónimos

2DE	Electroforese Bi-dimensional
AD	Acil-CoA Desidrogenase
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BN	Blue Native
CK	Creatina Cinase
CoA	Coenzima A
CPTI/II	Carnitina PalmitoilTransferase I/II
DO	Densidade Óptica
EH	Enoil-CoA Hidratase
ETC	Electron Transfer Chain (Cadeia Transportadora de Electrões)
ETF	Electron-transferring Flavoprotein (Flavoproteína Transportadora de Electrões)
ETF - QO	Flavoproteína Transportadora de Electrões – Ubiquinona Oxireductase
ETFDH	Electron-transferring Flavoprotein Dehydrogenase (Flavoproteína Transportadora de Electrões Desidrogenase)
FAD	Dinucleótido de Flavina e Adenina
FAO	Fatty Acid Oxidation (Oxidação de Ácidos Gordos)
GA II	Glutaric Acidémia (Acidúria) type II
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GOA	Gene Antology Annotation
GPS	Global Protein Server
GST	Gltationa S-Transferase
HAD	Hidroxiacil-CoA Desidrogenase
Hsp	Heat shock protein
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
KT	Tiolase
LCAD	Acil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Cadeia Longa
LCHAD	Hidroxiacil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Cadeia Longa
MADD	Deficiência Múltipla de Acil-CoA Desidrogenase

MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MCAD	Acil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Cadeia Média
MnSOD	Superóxido Dismutase
MS	Espectometria de Massa
MTP	Mitochondrial Trifunctional Protein (Proteína Trifuncional Mitocondrial)
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PQC	Protein Quality Control (Controlo de Qualidade de Proteínas)
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies Reactivas de Oxigénio)
S/MHAD	Hidroxiacil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Cadeia Curta/Média
SCAD	Acil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Cadeia Pequena
SMSL	Síndrome de Morte Súbita do Lactente
TOF	Time of Flight
UQ	Ubiquinona
VDAC	Voltage-Dependent Anion-Selective Channel
VLCAD	Acil-CoA Desidrogenase de Ácidos Gordos de Muito Longa

I - Introdução

A oxidação mitocondrial de ácidos gordos (FAO), genericamente designada por β – oxidação mitocondrial, é um processo metabólico importante para a obtenção de energia por parte de órgãos como o coração e o músculo esquelético [1]. Este processo metabólico tem vindo a ser largamente estudado, especialmente por testes genéticos, por se encontrar intimamente ligado a uma classe de doenças hereditárias cujo interesse tem vindo a crescer [2]. Estas doenças caracterizam-se por défices de proteínas envolvidas na β – oxidação, e embora as mutações genéticas subjacentes estejam já largamente caracterizadas, as suas consequências a nível fenotípico ainda não se encontram clarificadas.

Em Portugal, o programa nacional de diagnóstico precoce rastreia actualmente 24 doenças hereditárias do metabolismo em praticamente todos os recém-nascidos do país, estimando-se uma frequência das mesmas de 1:2396 [3]. Deste programa constam várias doenças da oxidação mitocondrial de ácidos gordos das quais o défice da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD) é de entre as patologias rastreadas a que apresenta maior incidência no país. A deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenases (MADD) é um dos défices da β -oxidação mitocondrial rastreado e segundo o relatório de 2009 do programa nacional de diagnóstico precoce [4] tem uma incidência de 1:149664. Esta doença pode apresentar uma sintomatologia severa, detectada usualmente em recém-nascidos e levando a maioria das vezes à morte prematura do paciente; ou na apresentação moderada da doença, os sintomas surgem mais tardiamente e de forma menos grave, permitindo ao paciente, na maioria das vezes, um estilo de vida normal. O genótipo associado à MADD caracteriza-se por mutações em um dos seguintes genes - *ETFDH*, *ETFA* ou *ETFB* - resultando em alterações em duas proteínas, na flavoproteína transportadora de electrões desidrogenase (ETFDH) ou na flavoproteína transportadora de electrões (ETF) subunidade α ou β , comprometendo deste modo a incorporação dos equivalentes reduzidos provenientes de várias desidrogenases na cadeia transportadora de electrões [5].

Adicionalmente aos défices nas desidrogenases e de carnitina, recentemente têm sido reportados casos de MADD do tipo III que apresentam défices a nível da ubiquinona ou dos complexos da cadeia transportadora de electrões, e ainda pacientes que respondem a tratamento com riboflavina, embora ainda não se compreenda qual o mecanismo subjacente. Deste modo o estudo da MADD apresenta-se como um desafio para o qual são

necessários mais estudos com novas abordagens metodológicas cujos resultados obtidos ajudem a estabelecer novas estratégias de diagnóstico e tratamento [6].

No âmbito da presente dissertação procedeu-se à caracterização do proteoma mitocondrial de dois pacientes diagnosticados com MADD do tipo III, um dos quais com uma mutação no gene *ETFDH* e outro no gene *ETFB*. Para o efeito isolou-se a fracção mitocondrial de fibroblastos obtidos de biopsias da pele, analisou-se o proteoma utilizando para tal uma abordagem metodológica baseada no perfil obtido por electroforese bi-dimensional (2DE), identificaram-se as proteínas mitocondriais por espectometria de massa e analisou-se a expressão de proteínas específicas por *western blot*.

II - Estado da Arte

1. Oxidação Mitocondrial de Ácidos Gordos (FAO)

Os lípidos, macromoléculas constituídas por ácidos gordos, possuem grande eficiência energética e representam, por isso, a principal reserva energética do organismo. A oxidação mitocondrial de ácidos gordos, ou β – oxidação mitocondrial, é o principal processo de oxidação de ácidos gordos do organismo [1, 7]. A oxidação destes lípidos pode também ser realizada a nível peroxissomal, embora em menor escala e especialmente para ácidos gordos de cadeia muito longa (com mais de 20 carbonos) (Figura 1) [2, 8, 9].

A β – oxidação mitocondrial (FAO), descrita pela primeira vez em 1904 por Franz Knoop e confirmada em 1950 [9], é o principal processo de obtenção de energia utilizado pelo coração e músculo esquelético, produzindo moléculas de acetil-CoA que podem originar ATP via ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa [7, 8]. Este é também um processo muito importante para o fígado, embora com um papel um pouco diferente, isto é, no fígado a FAO é também utilizada para a obtenção de acetil-CoA mas esta é encaminhada para a gluconeogénese e cetogénese, especialmente quando as concentrações sanguíneas de glucose se encontram muito baixas [1, 9, 10]. Existem ainda outros órgãos com capacidade de realização da β – oxidação mitocondrial, embora de uma forma muito limitada, como o rim, o intestino delgado ou o tecido adiposo, e que têm como principal objectivo a produção de glucose e corpos cetónicos [11]. O cérebro é outro órgão que possui baixa capacidade de realização da FAO e que utiliza prioritariamente o metabolismo da glucose e dos corpos cetónicos produzidos maioritariamente no fígado (Figura 1) [10], deste modo em episódios de stress metabólico ou jejum o cérebro pode ver-se privado destes metabolitos, podendo ocorrer colapsos metabólicos ou convulsões [10].

Sendo que a FAO se realiza no interior da mitocôndria, é essencial que os ácidos gordos a oxidar sejam encaminhados até à sua matriz. Para tal é necessário libertar, através do catabolismo dos lípidos, os ácidos gordos que se encontram no tecido adiposo, essencialmente nos triglicerídeos, para a corrente sanguínea [2, 10]. Deste modo, estes ácidos poderão ser mobilizado para as células, e posteriormente para as mitocôndrias onde se realizará a sua oxidação [2]. Os ácidos gordos de cadeia curta e média são capazes de atravessar a membrana mitocondrial e são por isso esterificados a acil-CoA já na sua matriz. No entanto, para os de cadeia longa é necessária uma maquinaria de transporte própria para que possam atravessar a membrana mitocondrial. Esta maquinaria envolve

Este passo é catalisado por uma enzima muito conhecida e vulgarmente designada por tiolase (KT), e implica a entrada de uma CoA. Para além destes 4 passos, a FAO envolve ainda o transporte e activação dos ácidos gordos, bem como a entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico e de equivalentes reduzidos na ETC (Figura 1) [8, 12].

1.1. Sistemas Enzimáticos da FAO

As enzimas e proteínas transportadoras intervenientes na FAO são codificadas pelo ADN nuclear, uma vez que o ADN mitocondrial codifica apenas 13 subunidades proteicas constituintes dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial [2, 13]. Assim sendo, as proteínas da FAO são sintetizadas a nível dos ribossomas citosólicos e a sua sequência num dos terminais (*leader peptide*) indica às *chaperones* que deve ser encaminhada para a mitocôndria [14]. Após a sua síntese, as sequências peptídicas destas proteínas são envolvidas pelas *chaperones* Hsp70 que facilitam a entrada das proteínas na mitocôndria. Na mitocôndria estas proteínas são *folded* e incorporadas no processo metabólico por outras *chaperones*, tais como as Hsp60/10 [15]. Estes processos de síntese, transporte e *folding* das proteínas são de crucial importância para a actividade de cada uma das enzimas, uma vez que se pensa ser nestes passos que se dão as alterações que ditam os fenótipos observados nos défices que serão abordados posteriormente no ponto das doenças da β – oxidação mitocondrial (Capítulo II.2.1) [13].

A maquinaria enzimática associada à FAO é complexa, e tem sido bastante estudada ao longo dos últimos anos, muito embora a organização e o modo de interacção entre estas proteínas não esteja ainda bem definido [13]. Conhecem-se hoje pelo menos 25 enzimas ou proteínas intervenientes na β -oxidação mitocondrial [2]. A maioria destas enzimas e proteínas, que têm um papel fulcral na FAO, e encontram-se listadas na Tabela 1. Na Figura 2 é apresentado, de forma esquematizada, o processo de oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, incluindo a enzima responsável por cada passo.

Tabela 1 - Enzimas intervenientes na β -oxidação mitocondrial. Adaptado de [7].

Enzima	Abreviatura	Estrutura	Peso Molecular (kDa)
Acil-CoA sintase		Desconhecida	78
Carnitina palmitoil transferase I (Fígado)	ICPTI	Desconhecida	88
Carnitina palmitoil transferase I (Músculo)	mCPTI	Desconhecida	82
Carnitina acilcarnitina translocase		Desconhecida	32,5
Carnitina palmitoil transferase II	CPTII	Desconhecida	68
Acil-CoA desidrogenase cadeia muito longa	VLCAD	Homodímero	150
ACAD-9	ACAD-9	Homodímero	140
Acil-CoA desidrogenase cadeia longa	LCAD	Homotetrâmero	180
Acil-CoA desidrogenase cadeia média	MCAD	Homotetrâmero	180
Acil-CoA desidrogenase cadeia curta	SCAD	Homotetrâmero	168
Proteína Trifuncional	MTP	Hetero-octâmero	
2-enoil-CoA hidratase de cadeia longa			
3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa	LCHAD		
3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa			
2-enoil-CoA hidratase de cadeia curta		Homo-hexâmero	164
3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta	SCHAD	Homodímero	68
3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia curta		Homotetrâmero	169
3-cetoacil-CoA tiolase geral	KT	Homotetrâmero	200
Flavoproteína transportadora de electrões	ETF	Heterodímero	57
ETF:Ubiquinona oxidoreductase	ETF:QO	Monómero	68
Carnitina acetiltransferase	CAT	Monómero	60
2,4-Dienoil-CoA redutase		Homotetrâmero	124
Δ^3,Δ^2 -enoil-CoA isomerase de cadeia curta		Homodímero	70
Δ^3,Δ^2 -enoil-CoA isomerase de cadeia longa		Desconhecida	200
$\Delta^3,\Delta^2,\Delta^4$ -dienoil-CoA isomerase		Homotetrâmero	126

As primeiras enzimas a intervir na FAO são as **Acil-CoA Sintases**, que esterificam os ácidos gordos a ésteres de acil-CoA a partir da hidrólise de ATP em 2Pi (gasto de 2 ligações fosfoanidridicas) [8]. Existem 3 tipos de acil-CoA sintases mediante o tamanho do ácido gordo em que actuam (cadeia curta, média ou longa), em que apenas a acil-CoA sintase de cadeia longa tem actividade na membrana externa da mitocôndria, pois estes ácidos gordos necessitam de ser activados antes de entrar naquele organelo [1, 9]. As restantes duas acil-CoA sintases encontram-se na matriz mitocondrial, pois os ácidos gordos sobre os quais actuam têm a capacidade de atravessar a membrana mitocondrial e só sofrem esterificação no seu interior [7].

As **Carnitina PalmitoilTransferases I e II (CPTI/II)** são as enzimas responsáveis pela transferência do acil-CoA de cadeia longa (pois os de cadeia média e curta não necessitam deste transporte) para a carnitina (CPTI) e de volta para a Coenzima-A (CPTII). A CPTI é a enzima responsável pela transferência do ácido gordo para a carnitina e representa o maior ponto de regulação da FAO, pois a sua actividade é inibida na presença de malonil-CoA (este encontra-se mais concentrado no organismo quando nos encontramos bem alimentados) [1, 16]. Existem 2 isoformas da CPTI, a L e a M, a do fígado e do músculo respectivamente, estando ambas presentes no coração [1, 7]. A isoforma L da CPTI é mais sensível à regulação por malonil-CoA do que a isoforma muscular [1]. Enquanto a CPTI se encontra associada à face interna da membrana externa da mitocôndria, a CPTII encontra-se associada à face interna da membrana interna da mitocôndria, e realiza o processo inverso ao da CPTI (transfere o ácido gordo da acilcarnitina para formar acil-CoA) [11].

Como proteína transmembranar e com a função de mediar a translocação entre a acilcarnitina e a carnitina de e para a matriz mitocondrial encontra-se a **Carnitina-Acilcarnitina Translocase** [2, 7].

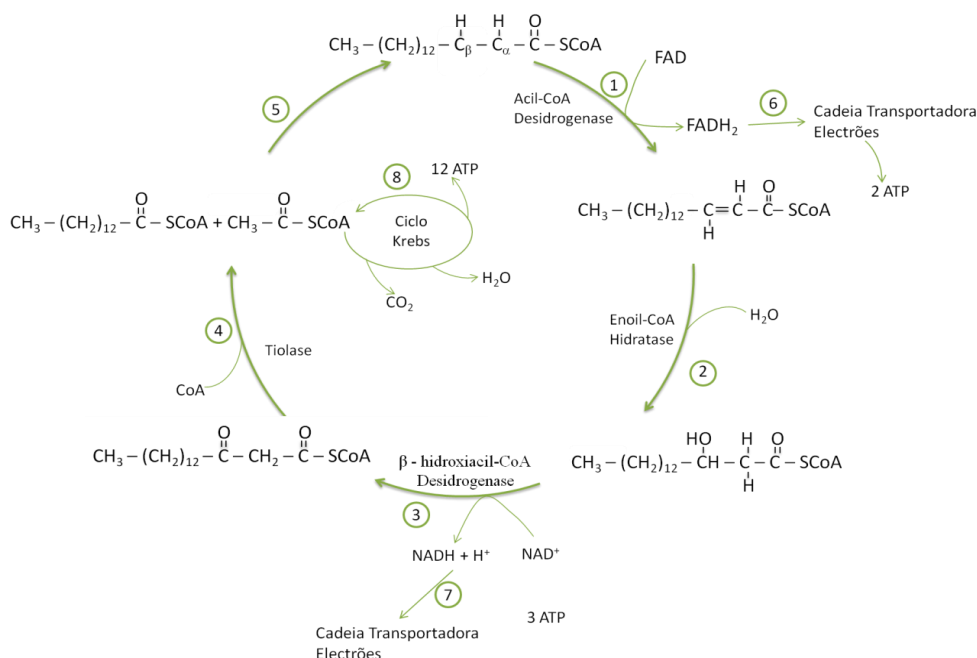


Figura 2 - Esquematização do processo da FAO tomando por exemplo o palmitato, em que os passos de 1 a 5 esquematizam os 4 principais passos da β - oxidação e os passos de 6 a 8 representam os processos de obtenção de energia a partir da acetil-CoA. Adaptado de [17].

O primeiro passo das 4 etapas principais da FAO que levam ao encurtamento da cadeia do ácido gordo é catalisado por um grupo de enzimas chamadas **Acil-CoA Desidrogenases (AD)**, que são proteínas que possuem FAD como grupo prostético [7]. São conhecidas AD de ácidos gordos de cadeia curta (SCAD), cadeia média (MCAD), longa (LCAD) e muito longa (VLCAD), sendo que as primeiras três são homotetrâmeros e encontram-se na matriz da mitocôndria [15]. A VLCAD encontra-se associada à membrana interna da mitocôndria e possui actividade para os ácidos gordos de cadeia longa [1, 2], existindo evidências de que actua nos mesmos substratos que a LCAD, embora a função desta última não seja ainda inteiramente compreendida, supondo-se que seja mais importante na oxidação de ácidos gordos insaturados [11]. Recentemente foi descoberta uma proteína designada por ACAD-9, que se assemelha à VLCAD, com grande actividade para o palmitoil-CoA e presente em níveis substanciais no cérebro, sabendo-se hoje que possui funções a nível do *assembly* do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial [11, 18, 19].

A **Flavoproteína Transportadora de Electrões (ETF)** é a proteína que recebe no seu grupo prostético FAD os electrões provenientes do FADH_2 da AD, reoxidando-o a FAD. A flavoproteína transportadora de electrões foi inicialmente identificada por Crane e Beinert em 1956 [20] pela sua capacidade de transferir equivalentes reduzidos provenientes das acil-CoA desidrogenases [20, 21]. Esta flavoproteína recebe electrões provenientes de pelo menos 11 desidrogenases transferindo-os posteriormente para a **Flavoproteína Transportadora de Electrões Desidrogenase (ETFDH)**. A ETFDH é a enzima responsável pela incorporação destes electrões na cadeia transportadora de electrões via coenzima Q [22]. Dado que os doentes estudados no âmbito desta dissertação apresentam mutações nos genes que codificam estas proteínas, é importante conhecer mais detalhadamente a sua estrutura e função no processo da FAO.

A ETF é uma proteína constituída por duas subunidades: α^1 e β^2 . A subunidade α apresenta um peso molecular de 30 kDa e uma estrutura primária com 333 aminoácidos e a subunidade β um peso molecular de 28 kDa com 255 aminoácidos [22-25]. Estas subunidades são codificadas por genes denominados de *ETFA* e *ETFB* [23-25], no cromossoma 15 e 19 respectivamente, e muito embora a subunidade α possua um *leader*

¹ Registada na Uniprot sob o código P13804.

² Registada na Uniprot sob o código P38117.

peptide que indica a sua localização na mitocôndria, necessitando por isso de maturação, a subunidade β não o possui sendo-lhe apenas retirada a metionina iniciadora. Cada dímero da proteína liga um cofactor, o FAD, e um AMP [22-24].

A estrutura tridimensional da ETF, que se encontra representada na Figura 3, possui três domínios: domínio I (a região N-terminal da subunidade α), o domínio II (a região C-terminal subunidade α e uma parte da região C-terminal da subunidade β) e o domínio III (grande parte da subunidade β) [21, 26]. Tem sido sugerido que esta proteína possui uma conformação dinâmica na sua forma livre podendo a posição destes três domínios variar uns em relação aos outros [26]. Embora não se compreenda totalmente quais os domínios de ligação a cada cofactor e à ETFDH, tem sido sugerido que o FAD se encontre maioritariamente em interacção com aminoácidos da subunidade α interagindo com apenas três aminoácidos da subunidade β (Y16, P40 e F41) e que o AMP se encontra maioritariamente em ligação com a subunidade β [21, 26, 27]. Actualmente pensa-se que a interacção com a ETFDH se faz maioritariamente através da subunidade β [26, 28].

A ETF é considerada uma proteína presente na matriz mitocondrial. No entanto, alguns estudos sugerem que esta proteína pode encontrar-se também ligada à membrana interna da mitocôndria em interacção com a ETFDH ou possivelmente a outros complexos da ETC [29].



Figura 3 - Representação esquemática da ETF. Na imagem estão representadas as duas subunidades da proteína α (a azul) e β (a azul lavanda), assim como os três domínios (em numeração romana), a amarelo encontra-se representado o cofactor FAD e a verde o AMP [21].

A Flavoproteína Transportadora de Electrões Desidrogenase, também designada de Flavoproteína Transportadora de Electrões – Ubiquinona Oxireductase (ETF:QO), é uma proteína mitocondrial que se encontra ligada à membrana interna da mitocôndria [30, 31], e que foi primeiramente descrita por Ruzicka e Beinert em 1975 [32]. A ETFDH humana³ apresenta uma estrutura monomérica de 64 kDa e é constituída por 617 aminoácidos cuja sequência é conhecida [22, 25, 33]. Na sua estrutura apresenta três domínios funcionais: dois cofactores, um FAD e um cluster 4Fe4S, e um domínio de ligação à Ubiquinona [25, 31, 33]. A estrutura desta proteína encontra-se representada na Figura 3, onde se podem observar, para além dos três domínios funcionais, as 11 α -hélices e as 19 folhas- β características da sua estrutura secundária [30]. A ETFDH é codificada pelo ADN nuclear, no gene *ETFDH* que se localiza no braço longo do cromossoma 4 [31, 33, 34]. A ETFDH é importada do citosol para a mitocôndria com 67 kDa, sendo maturada na mitocôndria para a proteína de 64 kDa por remoção de 33 aminoácidos do terminal amínico que funcionam como *leader peptide* [14, 30, 31].



Figura 4 - Representação esquemática da ETFDH. Na imagem estão representados três domínios (FAD (azul), *cluster* 4Fe4S (vermelho), e domínio de ligação à UQ (verde)), assim como o FAD (amarelo ouro), o *cluster* 4Fe4S (magenta), e a UQ (vermelho escuro). As α - Hélices e as Folhas- β estão numeradas sequencialmente do terminal amínico para o carboxílico [30].

³ Registada na Uniprot sob o código Q16134.

A principal função da ETFDH é a introdução na ETC de electrões provenientes de pelo menos 11 proteínas desidrogenases do metabolismo dos ácidos gordos, aminoácidos e colina [22, 25, 29]. Estes electrões são recebidos pela ETFDH através da Flavoproteína Transportadora de Electrões (ETF) e são introduzidos na cadeia transportadora de electrões através da redução da Ubiquinona (UQ) pela ETFDH [30, 35]. Assim sendo, a ETFDH, através da oxidação da ETF e redução da Ubiquinona, liga o processo da β – oxidação à produção de energia via ETC, muito embora os mecanismos moleculares subjacentes a esta reacção não sejam claros [30]. Alguns autores propõem que o percurso realizado pelos electrões envolve a passagem do FAD da ETF para o FAD da ETFDH, reduzindo o *cluster* 4Fe4S que, por sua vez, transfere o electrão para a UQ. Uma vez que este *cluster* apenas aceita e transfere um electrão de cada vez, a UQ também recebe apenas um electrão de cada vez formando-se um intermediário denominado por ubisemiquinona [28]. No entanto, no estudo de Zhang *et al.* [30] a estrutura proposta para esta proteína sugere que provavelmente a UQ é reduzida pelo domínio FAD da ETFDH e não pelo *cluster* 4Fe4S.

O segundo dos quatro principais passos da FAO é mediado pelas **Enoil-CoA Hidratases**. À semelhança do que acontece para as restantes enzimas existem 3 tipos de hidratases que actuam em função do comprimento da cadeia do ácido gordo [8]. A enoil-CoA hidratase de ácidos gordos de cadeia curta foi a primeira enzima da FAO a ser isolada e foi genericamente designada por crotonase (por actuar preferencialmente no crotononil-CoA (C4)) e está presente na matriz mitocondrial [7]. A enoil-CoA hidratase de ácidos gordos de cadeia longa sabe-se agora pertencer a uma proteína trifuncional, e encontra-se associada à membrana interna da mitocôndria [7, 8, 11].

O terceiro passo da FAO corresponde a uma desidrogenação desta vez mediada por NAD^+ , e catalisado pelas **Hidroxiacil-CoA Desidrogenases (HAD)**. Existem duas formas da HAD, uma mais genérica que actua em ácidos gordos com comprimento entre os 4 e os 16 carbonos (S/MHAD), e uma HAD que actua em ácidos gordos de cadeia longa (LCHAD) [36]. A LCHAD encontra-se incorporada na proteína trifuncional e apresenta actividade máxima para o palmitoil-CoA [7, 36, 37]. A S/MHAD encontra-se na matriz mitocondrial e apresenta actividade máxima para o crotonil-CoA [7].

A tiólise do acil-CoA em acetil-CoA e $(n-2)$ acil-CoA, que corresponde ao quarto e último passo da FAO, é catalisada pela **Tiolase** (KT), também designada de 3-oxoacil-CoA tiolase, 3-cetoacil-CoA tiolase ou acil-CoA acetiltransferase [8]. Existem 3 formas desta enzima: duas são solúveis e encontram-se na matriz mitocondrial, em que uma actua em ácidos gordos de cadeia curta e a outra é chamada de geral pois tem actividade para ácidos gordos entre C6 e C16 (pode também ser chamada de tiolase de cadeia média); a KT que actua em ácidos gordos de cadeia longa pertence também à proteína trifuncional [7, 8, 11].

A **Proteína Trifuncional Mitocondrial (MTP)** é um hetero-octâmero com 4 subunidades α e 4 subunidades β e que incorpora as três enzimas (Enoil-CoA Hidratase, HAD e KT) [36-38]. Tem como substratos os ácidos gordos de cadeia longa e encontra-se associada à membrana interna da mitocôndria [39]. As subunidades α comportam as actividades de hidratase e de hidroxiaçil-CoA desidrogenase e as subunidades β a função de KT [39].

1.2. Organização espacial dos Sistemas Enzimáticos associados à FAO

A organização dos sistemas enzimáticos da β – oxidação mitocondrial ainda não é totalmente conhecida, embora tenham sido já documentadas interacções entre algumas das proteínas envolvidas [29]. Recentemente foram descritos complexos proteicos, como a MTP, que evidenciam a ocorrência de interacções entre as proteínas associadas a esta via metabólica, muito embora a organização espacial de todo o proteoma envolvido, assim como do metaboloma resultante, permaneça por esclarecer [13].

Gregersen *et al.* [13] propuseram a existência de um hipotético complexo enzimático que se encontra ilustrado na Figura 5. Esta hipotética organização procura englobar todos os pressupostos até hoje conhecidos sobre a maquinaria enzimática da β - oxidação mitocondrial, embora careça de comprovação experimental. Por exemplo, pressupõe que várias enzimas se encontram associadas à membrana interna da mitocôndria, nomeadamente a ETFDH, a VLCAD e a MTP, e ainda que ocorrem interacções entre algumas das enzimas, tais como entre as AD e a ETF e entre esta e a ETFDH. Alguns complexos constituídos por várias destas proteínas, como o complexo entre MCAD e ETF, já foram mesmo isolados [29, 40].

Esta hipótese do complexo enzimático baseia-se também no facto de apenas se conseguirem localizar na mitocôndria pequenas quantidades dos metabolitos intermediários do processo livres [1, 41, 42], o que sugere que estes são encaminhados de centro activo em centro activo das enzimas. [13, 42]. Esta perspectiva de organização da maquinaria num único Complexo Enzimático permite ainda fazer algumas especulações sobre as consequências do défice de uma das enzimas da oxidação mitocondrial de ácidos gordos, pois neste caso cada um desses défices não afectará apenas o passo do processo metabólico que catalisa mas eventualmente todos eles [13].

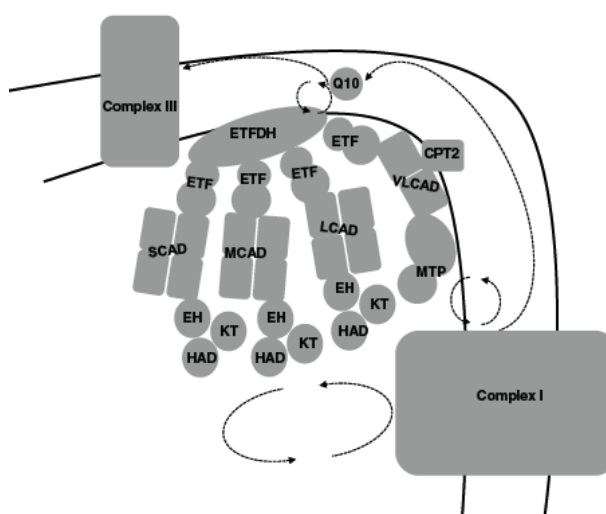


Figura 5 - Esquematização do hipotético Complexo Enzimático interveniente na via metabólica FAO [13].

Para melhor clarificar esta hipótese, a realização de novos estudos baseados na análise do proteoma mitocondrial poderão ajudar a compreender as consequências da ausência ou da forma alterada de uma dada proteína da FAO, levando possivelmente a uma melhor compreensão dos défices associados a esta via metabólica e das consequências funcionais dos mesmos [13].

2. Doenças Metabólicas

As doenças metabólicas são patologias caracterizadas pelo comprometimento de vias metabólicas, como a dos aminoácidos, lípidos, carboidratos ou metabolismo energético mitocondrial [43]. Muito embora existam doenças metabólicas que podem ser

adquiridas durante a vida de um indivíduo, como é o exemplo da Diabetes tipo II ou das hiperlipidémias [44, 45], a grande maioria são doenças resultantes de erros inatos [45]. As doenças metabólicas hereditárias são individualmente muito raras, apresentando usualmente incidências de cerca de 1:10000 [43, 45], e são resultantes de défices na actividade catalítica de enzimas chave que intervêm nas vias metabólicas, ou nas proteínas que possuem função de receptores ou transportadores [45, 46].

Este tipo de erros congénitos do metabolismo, e consequentemente estas doenças metabólicas, foi referido pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908 que verificou que algumas doenças, como a cistinúria ou a alcaptonúria, aparentemente derivavam da falha de um passo de uma via metabólica, manifestando-se nos indivíduos à nascença e persistindo por toda a sua vida, embora fossem no geral doenças “benignas” [45, 46]. No entanto, com a descrição da fenilcetonúria, uma outra doença hereditária descrita por Folling [47], conclui-se que estas doenças podem ter consequências graves, como o atraso mental [46]. Actualmente encontram-se descritos mais de 1000 erros genéticos que podem originar doenças metabólicas hereditárias, embora muitas possam ser controladas recorrendo a dietas alimentares ou a fármacos [48]. Estas doenças são maioritariamente herdadas em padrões autossómicos recessivos, havendo no entanto exemplos de doenças que podem ser derivadas de erros com manifestação autossómica dominante, como por exemplo a hipercolesterolemia familiar [45, 48].

De um modo geral estas doenças metabólicas podem ser divididas em 4 categorias, isto é: (i) doenças que levam à acumulação de compostos tóxicos; (ii) doenças que levam a grandes défices energéticos (associados especialmente a doenças metabólicas mitocondriais); (iii) doenças de armazenamento e (iv) doenças com consequências neurodegenerativas [48, 49].

Os sintomas associados a estas doenças metabólicas podem ser inespecíficos, especialmente nos primeiros meses de vida de uma criança, e podem ir desde vómitos recorrentes, hipotonia muscular, atraso psicomotor, a convulsões ou mesmo condições facilmente confundíveis com *sepsis* [49]. No entanto, em crianças um pouco mais velhas é possível detectar alguns sintomas mais específicos como odores na urina, alterações na pele, cabelo e olhos ou organomegalias [49].

Desde a década de 60, algumas destas doenças metabólicas têm vindo a ser associadas à síndrome de morte súbita do lactente (SMSL) que corresponde a mortes

repentinamente de crianças com idades compreendidas entre o 1 mês e 1 ano de vida [50]. Deste modo, o diagnóstico atempado destas doenças tornou-se imperativo, sendo o único modo de evitar graves sequelas ou a mortalidade prematura relacionada com algumas destas doenças metabólicas [51]. Actualmente é já realizado em vários países um rastreio neonatal que pode pesquisar mais de 30 doenças metabólicas recorrendo à espectrometria de massa *tandem* [52, 53], e são muitos os estudos que estão a ser realizados nesta área, tanto a nível de diagnóstico como de acompanhamento do tratamento destas doenças [51].

2.1. Défices da Oxidação Mitocondrial de Ácidos Gordos

As doenças associadas a défices do metabolismo de oxidação de ácidos gordos começaram a ser relatadas há relativamente pouco tempo mas têm sido bastante investigadas, uma vez que a grande maioria destas doenças são potencialmente fatais para os recém-nascidos [7, 54, 55]. O primeiro defeito genético com repercussões na oxidação mitocondrial de ácidos gordos foi descrito em 1973 por Di Mauro *et al.* [56], que reportaram um caso de défice da Carnitina Palmitoil Transferase II (CPT II) [41, 54, 56]. Desde então têm sido descritos vários défices da β – oxidação mitocondrial e identificados cada vez mais indivíduos que sofrem destas patologias [5, 7, 12]. São conhecidos, até hoje, pelo menos 22 défices de diferentes proteínas envolvidas na FAO, o que representa quase todos os passos desta via metabólica [2, 57].

Estas patologias envolvem alterações metabólicas em diferentes órgãos, especialmente a nível neuromuscular, do coração, e do fígado. Os sintomas associados são consequência de dois tipos de manifestações patológicas distintas mas interligadas: (i) devido à ineficácia do processo metabólico, com consequentes défices de produção de energia; (ii) devido à acumulação de intermediários metabólicos que se tornam tóxicos para as células [58] ou mesmo de ROS (Espécies Reactivas de Oxigénio) que se formam por falta de encaminhamento dos equivalentes reduzidos para a ETC [13, 15]. A β – oxidação mitocondrial é crucial para os primeiros dias de vida de qualquer indivíduo uma vez que à nascença as reservas de glicogénio são muito limitadas [54].

Assim, perante stress metabólico, jejum prolongado ou infecções virais o indivíduo poderá não sobreviver, pelo que estes défices são normalmente detectados logo em recém-nascidos [10]. No entanto, se o défice for menos severo poderá ser detectado já em idade adulta ou chegar mesmo a nunca se manifestar [2]. Os défices da maquinaria responsável

pela oxidação de ácidos gordos de cadeia longa estão geralmente associados a uma sintomatologia mais severa, levando muitas vezes à morte e morbidade infantis. A maioria dos distúrbios associados a enzimas específicas do metabolismo de ácidos gordos de cadeia média são menos severos; os indivíduos apresentam normalmente episódios de hipoglicémia e perda de consciência, que no entanto podem levar ao coma e à morte prematura se não forem diagnosticados e tratados atempadamente [2, 5].

2.1.1. Mecanismos genéticos e moleculares subjacentes aos défices da FAO

Os mecanismos genéticos subjacentes aos défices da FAO têm sido muito caracterizados ao longo dos últimos anos [13], mas tem-se vindo a verificar que indivíduos com comprometimento da mesma proteína podem apresentar sintomas muito distintos, o que sugere, para uma grande parte dos défices da β -oxidação mitocondrial, a ausência de uma relação genótipo-fenótipo bem definida [5, 13, 15].

Para défices das enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos gordos de cadeia longa esta relação genótipo-fenótipo está bem estabelecida, ou seja, quando ocorrem mutações de natureza mais severa as consequências a nível metabólico e sintomático são graves e para mutações mais leves os sintomas são menos severos [5, 57]. O mesmo não se verifica para os défices das enzimas envolvidas na oxidação mitocondrial de ácidos gordos de cadeia média e curta, não se observando uma relação clara entre a natureza das mutações e a severidade dos sintomas apresentados pelos pacientes [5, 59, 60].

Vários estudos têm vindo a demonstrar que são vários os tipos de mutações que dão origem aos défices proteicos da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos [5]. No entanto, a maioria das alterações genéticas descritas são devidas a mutações *missense* [5, 13, 41] e são usualmente herdadas num padrão autossómico recessivo [54].

O défice da FAO mais frequentemente reportado é o MCADD (Défice da acil-CoA desidrogenase de cadeia média), em que 80% dos casos relatados apresentam ocorrência homozigótica da mutação *missense* g.A985G, e 18% dos casos apresentam esta mesma mutação em apenas um alelo [6, 59, 61]. A relação genótipo-fenótipo para este défice não tem sido possível de estabelecer uma vez que, por exemplo, para pacientes cujo genótipo se apresenta como a combinação desta mutação com uma outra menos recorrente os fenótipos que surgem são muito distintos e podem variar desde o assintomático à morte

súbita prematura, sugerindo que a severidade da doença possa estar dependente de variações celulares, consequência de stress metabólico, febre ou jejum [61, 62].

Pensa-se que a principal consequência destas mutações *missense*, ou até mesmo de pequenas deleções ou inserções, dão origem principalmente a erros a nível do *folding* da proteína [60] ou à transcrição errada do *leader peptide*, dificultando ou impedindo a chegada da enzima à matriz mitocondrial [13]. No entanto, estudos recentes propõem a hipótese de que esta mutação (g.A985G), que origina a substituição de uma lisina por um glutamato na posição 329, possa levar a um ganho de função secundária residual por parte da proteína alterada o que poderá também justificar a fraca relação genótipo-fenótipo que este défice apresenta [6, 61, 62].

O *folding* alterado das enzimas pode originar uma perda parcial ou total da função das mesmas [5, 15, 63], e tendo em consideração as hipóteses que foram colocadas recentemente sobre a organização espacial da maquinaria da FAO (Capítulo II.1.2), pode ainda comprometer a função de outras enzimas [13]. Outra das hipóteses que tem sido sugerida refere que as proteínas com enrolamento incorrecto não são incorporadas no processo metabólico, e consequentemente agregam-se e acumulam-se noutros locais da mitocôndria interferindo deste modo com outros processos mitocondriais [13, 63, 64] (Figura 6). Para além destas teorias, tem sido sugerido que doenças relacionadas com a alteração do *folding* de proteínas estão relacionadas com um aumento do stress oxidativo [15, 64].

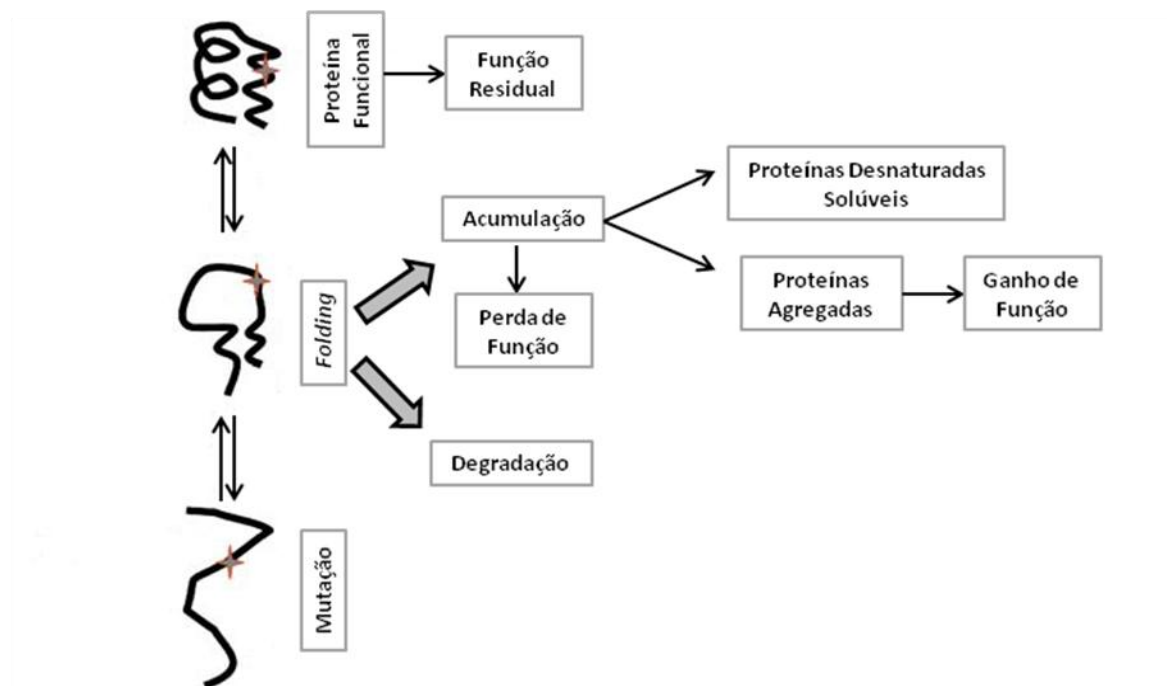


Figura 6 - Possíveis destinos das proteínas com alteração do *folding* devido a uma mutação *missense* no ADN codificante. Adaptado de [6].

Schmidt *et al.* [15, 64] realizaram estudos sobre o défice da SCAD (Acil-CoA Desidrogenase de cadeia curta) associado a mutações que levam a erros de *folding* desta proteína, e constataram que quando se verifica a acumulação de agregados da proteína alterada, há um aumento de stress oxidativo com consequente aumento da concentração de antioxidantes ou da fissão mitocondrial, por um processo ainda não conhecido. No mesmo sentido, tem vindo a ser relatada a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) a partir do sistema ETF/ETFDH, por processos ainda não conhecidos, mas que sugerem estar relacionados com défices da passagem de equivalentes reduzidos das desidrogenases para a UQ [65].

No entanto, em alguns casos, como por exemplo na SCAD, algumas mutações *missense* (gC511T e gG625A) dão origem a enzimas com um *folding* pouco alterado e, por isso, com uma actividade próxima do normal [60, 63]. Mas com o aumento do stress celular os erros de *folding* podem aumentar e induzir a sintomatologia inerente a um défice desta proteína [13, 60]. Também Bross *et al.* demonstraram em 1997 que o comprometimento da MCAD pode ser modelado até um certo ponto pela quantidade de chaperoninas e pela diminuição da temperatura [62, 66].

Em alguns estudos estão ainda documentadas a ocorrência de mutações nulas, que levam à instabilidade e degradação do mRNA, o que faz com que a proteína seja sintetizada em concentrações muito abaixo do normal ou não seja sintetizada [5, 13].

Desta forma pode-se constatar que são várias as mutações descritas que dão origem a défices enzimáticos da FAO, e que as proteínas resultantes destes erros genéticos podem sofrer vários destinos podendo interferir com vários processos mitocondriais com repercussões para a célula e consequentemente para o organismo [13].

2.1.2. Abordagens utilizadas no diagnóstico dos défices da FAO

O diagnóstico dos défices da FAO foi efectuado durante anos pela análise da excreção de ácidos orgânicos pela urina, mas a possibilidade de analisar as acilcarnitinas plasmáticas, a partir dos anos 90, veio trazer enormes ganhos a nível da sensibilidade e especificidade [53].

O rastreio das doenças da FAO está, hoje em dia, incluído na maioria dos programas de rastreio neonatal dos países desenvolvidos e baseia-se essencialmente na avaliação das concentrações sanguíneas de acilcarnitinas, que deverão estar elevadas no caso da existência de défices da FAO [10, 58]. A confirmação do diagnóstico e a determinação do tipo de défice da FAO são realizadas recorrendo a ensaios enzimáticos realizados em culturas de fibroblastos obtidos do paciente por biopsia da pele [67], por quantificação dos vários ácidos orgânicos presentes na urina e/ou por testes genéticos [12, 13, 68].

Na Tabela 2 são indicados alguns sintomas associados aos défices da FAO, assim como alguns marcadores bioquímicos, testes e tratamentos que são utilizados para rastrear e tratar estas patologias nos indivíduos afectados.

Nos últimos anos tem-se utilizado como método de rastreio destas e de outras doenças metabólicas, a análise por espectrometria de massa *tandem* de uma gota de sangue seco colhida aos recém-nascidos entre os 3 e os 6 dias de vida [69]. Esta abordagem metodológica permite detectar precocemente mais de 30 doenças metabólicas, contribuindo para a diminuição das taxas de mortalidade e morbilidade infantis [52, 70, 71].

Tabela 2 - Resumo dos sintomas, testes bioquímicos e possíveis terapêuticas para os défices da β – oxidação mitocondrial [2].

Sintomas Sugestivos	Síndrome de Reye
	Hipotónia e/ou miopatia
	Neuropatia Periférica
	Níveis de consciência alterados
	Morte Súbita
Evidências Clínicas Sugestivas	Hipoglicémia hipocetótica
	Cardiomiopatia
	Arritmia Cardíaca
	Acidose metabólica inexplicável
	AFLP/HELLP
	Rabdomiólise recorrente
	Acidúria dicarboxílica
	Défices de carnitina
Avaliação laboratorial inicial	Falha hepática fulminante ou recorrente
	Sangue
	Glucose
	Ácidos gordos livres
	pH
	Amónia
	Carnitina
	Creatina Cinase
	Testes da função hepática
	Lactato/piruvato
	Electrólitos
Testes metabólicos específicos	Ácidos orgânicos/acilglicinas na urina
	Perfil plasmático de acilcarnitinas
	Perfil de ácidos gordos livres
	Estudos em fibroblastos
	Análise enzimática Específica
	<i>Challenge testing</i>
Possíveis terapêuticas	Dieta restrita em gorduras
	Suplemento com Triglicerídeos de cadeia média (não para o défice de MCAD)
	Ingestão elevada de calorias a partir de carboidratos em episódios de doença e stress
	<i>Nasogastric drip feeding</i>
	Amido de milho ao deitar
	Carnitina (apenas para défice nos transportadores)

Em Portugal o programa nacional de diagnóstico precoce surgiu no final dos anos 70 e rastreava inicialmente a fenilcetonúria e o hipotiroidismo congénito [3]. Actualmente, uma abordagem que usa espectrometria de massa tandem permite rastrear pelo menos 24

doenças metabólicas tratáveis, recorrendo ao perfil de aminoácidos e acilcarnitinas [3]. Deste programa nacional de diagnóstico precoce realizado pelo Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) consta o rastreio de alguns défices da β – oxidação mitocondrial, tais como a MADD, défices de MCAD, VLCAD, LCHAD, CPTI e CPTII [72]. Segundo o Relatório de 2009 do programa nacional de diagnóstico precoce [4], a doença hereditária do metabolismo mais detectada em Portugal foi o défice de MCAD com uma prevalência de 1/8804 recém-nascidos, sendo que a MADD teve uma prevalência de 1/149664.

2.2. Deficiência Múltipla de Acil-CoA Desidrogenases (MADD)

A Deficiência Múltipla de Acil-CoA Desidrogenase (MADD) é também conhecida por Acidémia ou Acidúria Glutárica do Tipo II (GA II) [25, 35, 73] e foi primeiramente descrita por Przyrembel *et. al* em 1976 [74]. A ocorrência desta doença tem sido associada a mutações nos genes que codificam a Flavoproteína Transportadora de Electrões Desidrogenase (ETFDH) e a Flavoproteína Transportadora de Electrões (ETF), muito embora se registem casos resultantes da incapacidade de síntese ou de entrada de FAD na mitocôndria, cofactor indispensável à função das duas proteínas [22, 75]. Em qualquer dos casos observa-se um comprometimento da produção de energia via fosforilação oxidativa a partir dos equivalentes reduzidos produzidos pelas desidrogenases que dependem da ETF [31].

Esta é uma doença hereditária, caracterizada por um padrão autossómico recessivo [25, 73] e está associada a problemas na produção de energia na mitocôndria a partir do metabolismo dos ácidos gordos, assim como do metabolismo dos aminoácidos e colina [76]. Esta doença obteve o seu nome por se detectarem níveis elevados de ácido glutárico no sangue e na urina dos pacientes [74]. Para além dos elevados níveis de ácido glutárico, os indivíduos diagnosticados com GAII apresentam níveis elevados de vários ácidos orgânicos, tais como lactato ou ácido etilmalónico, sarcosina e conjugados de glicina, no sangue e na urina e ainda hipoglicémia [25, 76, 77].

A MADD (MIM #231680) pode manifestar-se em recém-nascidos ou mais tardiamente, sendo variável a idade em que se manifestam os sintomas. O quadro clínico dos pacientes com este défice é muito variável, no entanto pode dizer-se que se dividem em três categorias: o tipo I, uma forma neo-natal com anomalias congénitas; o tipo II, uma

forma neo-natal sem anomalias congénitas; e o tipo III, uma forma tardia de aparecimento dos sintomas [25, 76].

Os pacientes que apresentam MADD do tipo I e II apresentam usualmente hipoglicemia não cetónica grave, acidose metabólica, excretam elevadas concentrações de derivados de ácidos gordos e aminoácidos e podem apresentar rins policísticos [25, 73, 76]. Os doentes com o tipo II distinguem-se dos do tipo I apenas por não apresentarem anomalias congénitas, e ambos os tipos são normalmente fatais no primeiro ano de vida pelo que os doentes têm uma esperança média de vida de apenas alguns meses [31, 78].

O tipo III da MADD é caracterizado por se manifestar em idades tardias apresentando sintomas muito variáveis. Usualmente os doentes sofrem de episódios letárgicos, náuseas, vômitos e dores abdominais, hipoglicemia e hepatomegalia especialmente durante episódios de stress metabólico [25, 73, 76]. Estes doentes podem ainda sofrer de dores musculares, fraqueza e cardiomiopatia [25, 76, 79]. Para este tipo de MADD é possível que apenas sejam detectadas elevadas concentrações de ácidos orgânicos na urina durante as crises e stress metabólico [76].

Devido à grande variabilidade de sintomas que os pacientes com MADD podem apresentar, nem sempre o diagnóstico desta doença é simples e rápido [78]. Em 1982, Gregersen *et al.* [80] reportaram um caso de um rapaz que apresentava deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenases mas que respondia a um tratamento com 3 doses diárias de riboflavina, deste modo foi pela primeira vez descrita a MADD que responde a este tratamento (RR-MADD) [81]. A RR-MADD é um caso específico de MADD moderada e apresenta sintomas muito semelhantes aos da MADD do tipo III sendo que alguns doentes apresentam, para além dos sintomas referidos, encefalopatia [31]. Em 2007, Olsen e seus colaboradores analisaram 15 doentes com RR-MADD e encontraram mutações no gene *ETFDH* em todos eles. No entanto, não é ainda possível estabelecer se os sintomas da doença se devem primariamente a mutações neste gene ou a um défice do metabolismo ou *uptake* do FAD agravado pelas mutações neste gene [31].

Em 2007 Gempel *et al.* reportaram 5 casos de défices de UQ com mutações no gene *ETFDH*. Com este estudo foi sugerido que a MADD do tipo III pode levar a um défice secundário de UQ [82]. Esta observação foi suportada por um estudo mais recente, em que doentes com RR-MADD resultante de mutações no gene *ETFDH* foram analisados tendo-se verificado que alguns apresentavam défices de UQ. Novos estudos que relacionem estes

dois défices são necessários para um melhor diagnóstico e delineamento de abordagens terapêuticas mais dirigidas para estes doentes [78].

O genótipo associado à MADD é muito heterogéneo, tendo sido até hoje descritas dezenas de mutações que podem causar a doença [34, 83, 84]. Esta variabilidade de mutações pode dever-se ao facto de a doença poder ser causada por mutações em três genes diferentes, e ainda por *backgrounds* genéticos distintos nas várias famílias [83].

Num estudo recente realizado por Wang *et al.* [83] foram descritos 51 pacientes chineses com MADD do tipo III com mutações homozigóticas no gene *ETFDH*, e cuja mutação *missense* mais frequente nesta amostragem foi c.G250A, que origina a substituição p.A84T no domínio funcional do FAD. Esta mutação foi descrita pela primeira vez em 2009 [78]. Neste mesmo estudo foram ainda descritas outras mutações *missense* no gene *ETFDH*, tais como, Y257C, Y333C e A215T (c.A770G, c.A998G e c.G643A, respectivamente) e ainda uma deleção (nucleótidos 1254-1257) e uma mutação *nonsense* (c.T1395G). Ainda neste estudo de Wang *et al.*, mas também em outros realizados anteriormente [78, 84], foi descrita a mutação que origina a substituição de aminoácidos p.R175H, e ainda para o mesmo aminoácido a substituição p.R175L [78]. Neste gene *ETFDH* mutações *nonsense* ou deleções (na zona de aminoácidos da proteína maturada ou no *leader peptide*) irão originar perdas totais ou acentuadas da actividade da proteína, por originarem proteínas truncadas ou que não possam ser colocadas no interior da mitocôndria. Algumas mutações *missense* poderão também induzir uma diminuição acentuada da actividade da ETFDH por impedimento do início da tradução da proteína ou por originarem proteínas com alterações conformacionais [34].

Nos genes *ETFA* e *ETFB* têm também vindo a ser descritas várias mutações que podem causar a doença, sendo que a mutação que origina a substituição p.T266M na subunidade α é relatada como sendo a mais frequente a originar MADD por défice de ETF, sendo este um aminoácido importante para a interacção com o cofactor desta proteína, o FAD [27]. Várias mutações que originam a proteína truncada, por deleções e mutações *nonsense* (como por exemplo a substituição c.R3X na subunidade α ou a deleção do nucleótido 77 ou 80 na subunidade β), ou a substituição de aminoácidos (como por exemplo a mutação p.G117R e p.G267R na subunidade α , ou p.T154M e p.C42R na subunidade β) têm sido reportados nestes genes [27, 84, 85].

O diagnóstico da MADD pode ser efectuado de várias formas, sendo usual a detecção do défice de ETF ou ETFDH em culturas de fibroblastos do paciente, embora se possa também utilizar procedimentos que medem o metabolismo dos ácidos gordos ou dos aminoácidos em qualquer tipo de célula [79] ou ainda efectuar estudos moleculares que caracterizem a mutação em questão [68]. Esta doença, à semelhança de outros défices da FAO, foi incluída em vários programas de rastreio neonatal [3, 70], com posterior confirmação por análises genéticas [78].

Para os casos mais graves de MADD, casos do tipo I e II, não existe um tratamento eficiente. Nos casos mais moderados têm sido sugeridos tratamentos com riboflavina, glicina e L-carnitina acompanhados por dietas pobres em gordura e proteínas [6]. Para os doentes que apresentem também défices de UQ tem sido sugerido um suplemento com ubiquinona [78], no entanto não existe ainda uma linha de tratamento estabelecida [78].

III - Objetivos

O objectivo geral do presente trabalho foi estudar as consequências de défices moderados de MADD no proteoma mitocondrial, relacionando-as com as alterações genéticas subjacentes. Como objectivos específicos para o desenvolvimento deste estudo pretendeu-se:

- (i) Avaliar, por *immunoblotting* com anticorpos específicos, as consequências dos défices de ETFDH (no Doente 1) ou ETFB (no Doente 2) na expressão da proteína “mutada” e respectiva localização celular;
- (ii) Traçar o perfil proteico mitocondrial e identificar as alterações de expressão proteica associadas à MADD;
- (iii) Relacionar as alterações do proteoma mitocondrial com as alterações genéticas subjacentes;

Após integração dos resultados obtidos espera-se obter uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à MADD que permita, no futuro, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais específicos e de terapêuticas mais dirigidas e eficazes.

IV - Materiais e Métodos

1. Desenho Experimental

De modo a alcançar os objectivos propostos foi delineado um protocolo experimental, representado no esquema abaixo (Figura 7).

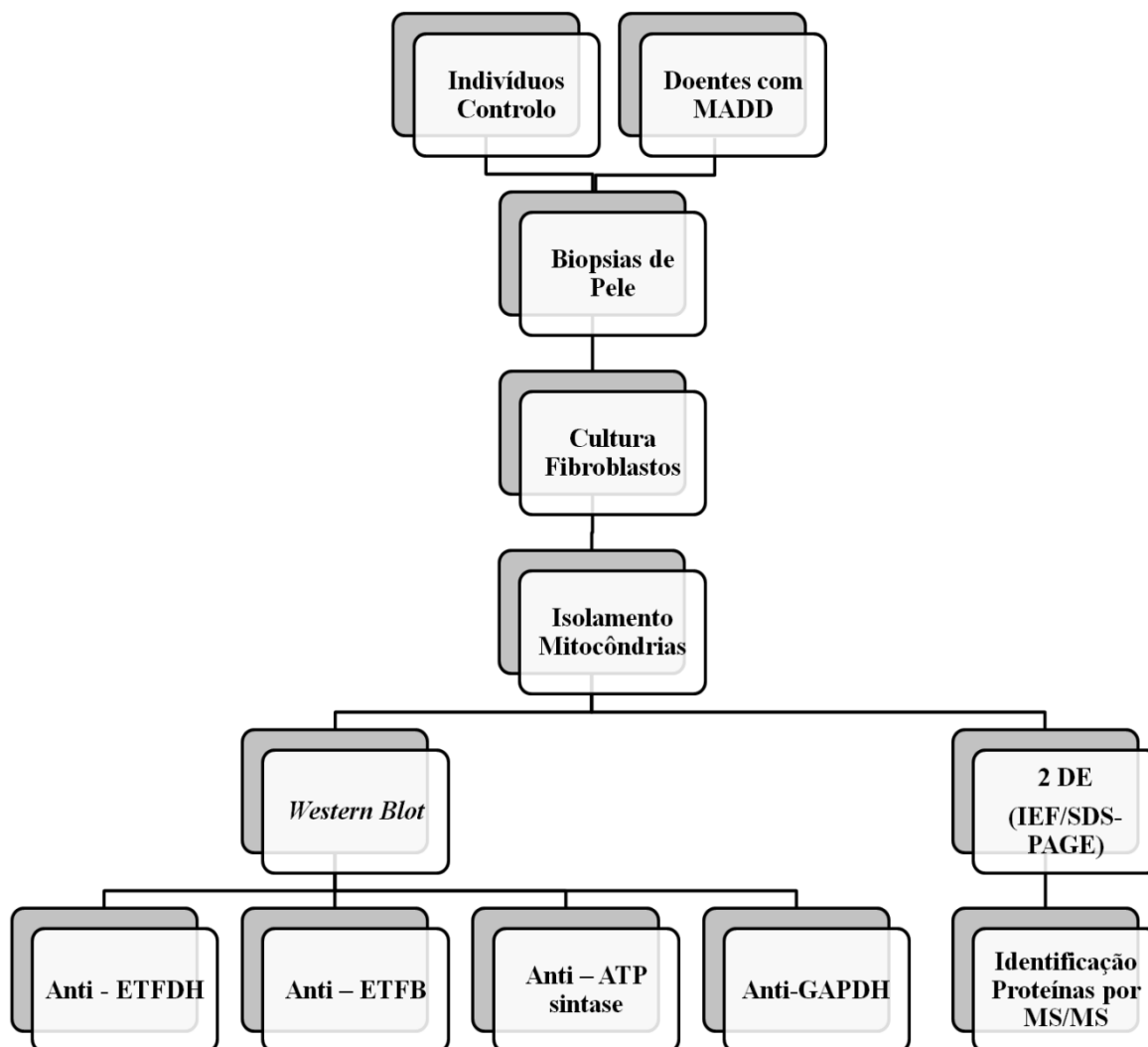


Figura 7 - Esquema representativo dos vários procedimentos utilizados para as análises bioquímicas realizadas nas amostras obtidas de indivíduos controlo e com MADD.

A abordagem proteómica utilizada baseou-se na caracterização do perfil proteico mitocondrial de doentes com MADD utilizando 2DE-MS/MS. A expressão de algumas proteínas alvo (ETFDH, subunidade β da ETF, subunidade β da ATP sintase e GAPDH) foi avaliada por *western blot*.

2. Caracterização das Amostras

Os doentes com MADD foram seleccionados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), e correspondem a um indivíduo com défice de ETFDH (Doente 1) e um indivíduo com défice de ETFB (Doente 2). O Doente 1 apresenta um défice de ETFDH moderado com aparecimento tardio, aos três anos de idade, o que resulta num diagnóstico de MADD do tipo III. O historial do doente revela consanguinidade e os sintomas na altura do aparecimento da doença eram vômitos recorrentes, intolerância ao exercício e níveis de Creatina Cinase (CK) aumentados, este doente responde a um tratamento de riboflavina, sendo que hoje em dia é um homem de 33 anos de idade que não apresenta sintomas associados à doença. Os estudos moleculares revelaram a presença de uma mutação p.P534L no gene *ETFDH* em homozigotia. O Doente 2, por sua vez, é uma mulher de 19 anos que apresenta um défice moderado de ETF subunidade β , diagnosticado aos dois anos de idade como MADD do tipo III. O historial do doente não revela consanguinidade e os sintomas observados na altura do aparecimento da doença resumiram-se a vômitos recorrentes, sendo que actualmente apenas apresenta dificuldades de aprendizagem. Os estudos moleculares revelaram a presença de uma mutação p.R191C no gene *ETFB* na forma homozigótica.

As amostras controlo (n=3) foram obtidas de indivíduos saudáveis após consentimento informado e foram utilizadas anonimamente.

3. Cultura Celular

As culturas celulares de fibroblastos foram preparadas a partir de biopsias de pele de indivíduos controlo e de indivíduos com MADD, em meio de cultura Ham F10 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 1% de penicilina, streptomycin e fungizona a 37°C. Uma vez atingida a confluência máxima, os fibroblastos foram removidos de 10 caixas de 75 cm² com tripsina, lavados com PBS e centrifugados a 500g durante 10 minutos. O *pellet* celular obtido (correspondente a aproximadamente 10⁷ células) foi utilizado para isolamento de mitocôndrias.

4. Isolamento de Mitocôndrias

O procedimento utilizado para o isolamento das mitocôndrias baseou-se no protocolo experimental descrito por Schwab *et al.* [86], que utiliza centrifugações diferenciais. Assim, o *pellet* celular foi primeiramente ressuspendido em tampão de isolamento (250mM sacarose, 1mM EGTA, 10mM HEPES, 5g/L BSA pH 7,5) e foi posteriormente centrifugado a 500g, a 4°C durante 2 minutos. O *pellet* obtido foi novamente ressuspendido em 750µl de tampão de isolamento, procedendo-se em seguida à homogeneização mecânica da suspensão celular por recurso a um *Potter-Elvehjelm*. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 1500g durante 10 minutos a 4°C, após o qual se recolheu o sobrenadante que foi conservado em gelo. O *pellet* resultante foi novamente ressuspendido, homogeneizado e centrifugado como descrito anteriormente. O *pellet* resultante, correspondente à fracção nuclear, foi ressuspendido em tampão de isolamento sem BSA e guardado a -80°C para futuras utilizações. Após a junção dos sobrenadantes resultantes das duas centrifugações do homogeneizado, procedeu-se a uma última centrifugação a 10000g a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante resultante desta centrifugação final corresponde à fracção citoplasmática e foi também guardado a -80°C. O *pellet* mitocondrial resultante foi lavado com tampão de isolamento sem BSA e guardado a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

5. Determinação da Concentração de Proteína total

A concentração de proteína total presente em cada uma das fracções (nuclear, citoplasmática e mitocondrial) isoladas a partir dos fibroblastos foi determinada com o kit comercial *RC DC Protein Assay* (BioRad®), que se baseia no método de Lowry *et al.* [87]. A densidade óptica foi lida a 750nm num leitor de placas (Multiskan Go, Thermo Scientific®). Simultaneamente foi efectuada uma recta de calibração com padrões de BSA, com concentrações entre os 10mg/ml e os 0,313mg/ml.

6. Separação das proteínas mitocondriais por electroforese bi-dimensional (2DE)

A separação electroforética bi-dimensional foi realizada de acordo com o previamente descrito por Vitorino *et al.* [88]. Assim, primeiro procedeu-se à focagem isoelectrica (IEF) de 200µg de fracção mitocondrial de fibroblastos de cada indivíduo em estudo. A amostra foi diluída até 250µl em tampão de rehidratação (8M ureia, 2M tiourea, 1% chaps, 12,9mM DTT, 0,1% pharmalyte 3-10, 0,01% azul de bromofenol) e aplicada num IPG strip Immobiline DryStrip pH 3-10NL de 13cm (GE Healthcare®). A focagem isoelectrica foi realizada com o seguinte programa: 12h de rehidratação a 50 mV, 2h a 150 V, 1h a 500 V, 1h a 1000 V e 3h a 8000V (*step-n-hold*).

Uma vez terminada a focagem isoelectrica, as tiras foram incubadas com tampão de equilíbrio (1,5M Tris pH 8,8, 6M ureia, 3,3M glicerol, 69mM SDS e 1,3mM DTT) à temperatura ambiente e com agitação, durante 15 minutos. De seguida procedeu-se à separação electroforética em gel de 12,5% SDS-PAGE (12x14cm) segundo o descrito por Laemmli *et al.* [89]. Esta foi realizada a 200V, 75mA e 15W durante aproximadamente 4 horas, tempo que demorou o azul de bromofenol atingir o final do gel.

Os géis foram revelados utilizando o corante Azul de Coomassie Coloidal (0,12% G250 em 20% de metanol) por incubação de 12 horas após fixação com uma solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético durante 1 hora. Os géis foram descorados fazendo várias lavagens com 25% de metanol, até todo o *background* ter sido eliminado, e por fim foram colocados em água destilada. Os géis 2DE foram digitalizados no Molecular Imager Gel Doc XR + System (Bio-Rad®) e analisados com o software *PQuest® 8.0 2D Analysis Software*. Para esta análise começou-se por definir os limites de densidade óptica, seleccionando-se para o efeito o spot com maior densidade óptica (DO), mas não saturado, e o spot com menor DO mas superior ao ruído de fundo do gel. Os spots foram assinalados automaticamente de acordo com os critérios definidos. Todos os spots foram verificados manualmente, tendo particular atenção os spots não assinalados bem como os sobrepostos nos spots de maior dimensão. Após o *matchset* procedeu-se à normalização das DO tendo como factor de correcção a razão da DO de cada spot individual vs a DO total do gel. Os valores obtidos de DO já normalizados foram exportados para uma folha de cálculo do Microsoft Office Excel® onde se procedeu ao cálculo dos rácios de DO, indicadores de

expressão proteica, entre o Doente 1 e os indivíduos controlo e o Doente 2 e os indivíduos controlo.

7. Digestão Triptica *in-gel*

Os *spots* dos géis 2DE foram excisados e posteriormente digeridos enzimaticamente de acordo com o protocolo descrito por Detweiler *et al.* [90]. Resumidamente, os *spots* foram lavados duas vezes com 50µl de hidrogenocarbonato de amónio a 50mM e 50% de acetonitrilo (ACN), de modo a desidratar e remover o corante do gel. Após secagem sob vácuo na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA), os *spots* foram incubados com 25µl de tripsina porcina modificada (Catálogo nº V511A, Promega Corporation, USA) com a concentração de 10µg/ml preparada em hidrogenocarbonato de amónio 50mM. Após 1 hora a 37°C foi adicionado hidrogenocarbonato de amónio 50mM de modo a cobrir todos os pedaços de gel, que permaneceram a 37°C durante a noite. As proteínas foram então extraídas com uma solução de ácido fórmico 10% e ACN 100%, secas sob vácuo e guardados a -80°C.

8. Análise por Espectrometria de Massa

Os digestos secos resultantes da digestão dos *spots* retirados dos géis 2DE foram ressuspendidos em 50% de ACN e 0,3% de ácido fórmico e aplicados numa placa de MALDI com matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL preparada em 50% ACN e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA)).

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com reflectrão em modo positivo e no intervalo de massa entre 700 e 4500Da.

Os espectros obtidos foram então processados e analisados pela Global Protein Server (GPS) Workstation (Applied Biosystems), que usa como motor de busca o Mascot (Matrix Science, London, UK) para a pesquisa de *peptide mass fingerprints* e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da SwissProt e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A tolerância de desvios de massa introduzidos na pesquisa para a massa do péptido foi de ± 30 ppm e para a massa dos iões fragmento foi de $\pm 0,3$ Da, a

identificação das proteínas foi aceite para um grau de confiança superior a 95% e quando considerados mais de quatro péptidos.

9. Western Blot

De modo a avaliar a expressão de proteínas específicas, aplicou-se um dado volume de amostra, correspondente a 20µg de proteína, de cada um dos indivíduos em estudo num gel de 12,5% SDS-PAGE, de acordo com o descrito por Laemmli *et al.* [89]. As proteínas foram posteriormente transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Millipore[®], porosidade de 0,45µm) por electrotransferência durante 3 horas a 200mA em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol).

De forma a evitar ligações não específicas, incubou-se a membrana com uma solução de 5% (m/v) de leite em pó magro em TBS-T (100mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, e 0,05% Tween 20). A membrana foi então incubada com anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (*rabbit* anti-ETFDH, abcam ab91508; *rabbit* anti-ETF subunidade β, abcam ab73986, *mouse* anti-ATP sintase subunidade β, abcam ab14730 ou *rabbit* anti-GAPDH ab9485) durante 2 horas à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4°C. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-*rabbit* ou anti-*mouse* acoplado com HRP (*horseradish peroxidase*) (GE Healthcare[®]) durante uma hora, ao fim da qual se efectuaram novas lavagens.

A imunodeteção das bandas correspondentes às proteínas em estudo foi realizada utilizando o reagente de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotech[®]), e as imagens obtidas em filmes raios-X (Kodak Biomax light Film, Sigma[®]) foram digitalizadas recorrendo ao Molecular Imager Gel Doc XR + System (Bio-Rad[®]) e analisadas com recurso ao software de análise QuantityOne (versão 4.6.3, Bio-Rad[®], Hercules, CA).

10. Análise Estatística

A comparação dos valores de densidade óptica nos *immunoblots* e nos géis 2DE entre cada doente com MADD e os indivíduos controlo foi efectuada através do teste de

Wilcoxon. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Para a realização desta análise recorreu-se ao software de análise estatística SPSS (versão 15.0).

V - Resultados

1. Caracterização dos casos de MADD analisados

Na Figura 8 é apresentada a estrutura primária e os domínios de estrutura secundária da ETFDH e da subunidade β da ETF, as proteínas cujos défices estão na base dos casos de MADD estudados.



Figura 8 - Sequência de aminoácidos das proteínas ETFDH (A) e ETF, subunidade β (B) segundo a Uniprot (www.uniprot.org). A amarelo é assinalada a alteração de aminoácidos (em A associada à mutação identificada no Doente 1 (p.P534L/p.P534L) e

em B à mutação encontrada no Doente 2 (p.R191C/p.R191C). Encontram-se ainda identificadas com rectângulos os elementos estruturais das proteínas, em que a magenta estão as α -hélices, a azul as folha- β e a verde as *turn*. O segmento a cinza corresponde ao *leader peptide* da proteína ETFDH, a rosa estão representados os aminoácidos que interagem com o FAD, a azul turquesa os de ligação ao *cluster* 4Fe4S, a verde tropa de ligação à UQ e a verde cinza o possível domínio transmembranar da ETFDH [21, 30].

Na Figura 8 estão assinalados alguns resíduos de aminoácidos da ETFDH e da ETF, subunidade β , com relevância estrutural e/ou funcional, e ainda o aminoácido cuja substituição resultou da mutação subjacente à patologia apresentada pelos doentes.

Pela análise da figura pode-se constatar que tanto no Doente 1 (Figura 8A) como no Doente 2 (Figura 8B) ocorreu uma mutação *missense* com substituição de um único aminoácido em cada uma das proteínas, ETFDH e ETFB, respectivamente. Esta substituição não ocorreu numa região com uma estrutura secundária definida. Fazendo o alinhamento da sequência primária de cada uma destas proteínas de várias espécies animais (tais como *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* ou *Arabidopsis thaliana*) e considerando outros estudos [30, 65], constata-se que o aminoácido P534 da ETFDH e o R191 da subunidade β da ETF são aminoácidos conservados entre as espécies.

No sentido de avaliar as consequências da alteração da sequência primária da ETFDH (Doente 1) e da subunidade β da ETF (Doente 2) na distribuição celular destas proteínas, procedeu-se à análise, por *western blot*, das várias fracções subcelulares.

Relativamente ao Doente 1 (Figura 9), na fracção mitocondrial não se detectou a presença de ETFDH por *western blot*, embora pareça estar presente nas outras fracções subcelulares analisadas. Efectivamente, na fracção citoplasmática não se registaram variações de densidade óptica significativas entre os indivíduos controlo e o doente. Na análise da fracção nuclear deste doente registaram-se valores de densidade óptica inferiores comparativamente com os registados para os indivíduos controlo.

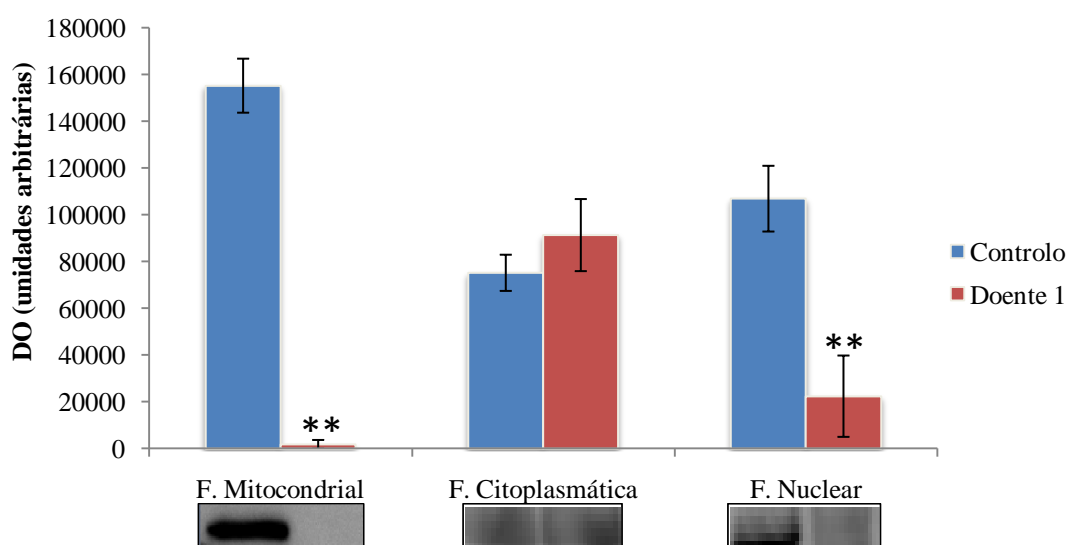


Figura 9 - Efeito da mutação p.P534L/p.P534L no gene *ETFDH* na expressão da desidrogenase no Doente 1, avaliada nas fracções mitocondrial, citoplasmática e nuclear. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *Western Blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

No Doente 2 avaliou-se a expressão da subunidade β da ETF por *western blot*. Como se pode observar da análise na Figura 10, esta proteína está presente na mitocôndria deste doente embora em níveis significativamente menores do que nos indivíduos controlo.

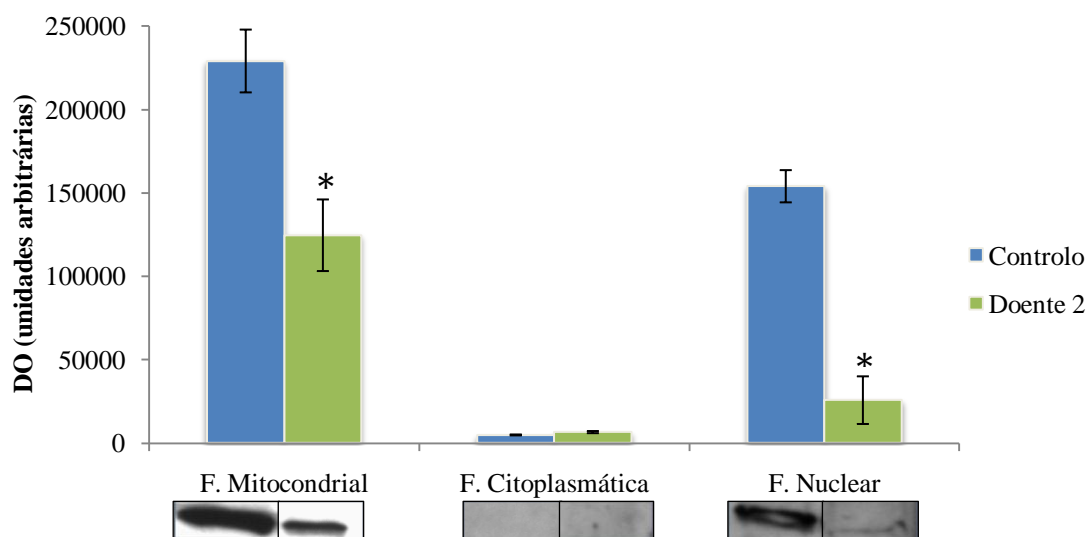


Figura 10 - Efeito da mutação p.R191C/p.R191C no gene *ETF* na expressão da subunidade β da ETF no Doente 2, avaliada nas fracções mitocondrial, citoplasmática e

nuclear. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *Western Blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Níveis significativamente inferiores desta proteína foram também observados na fracção nuclear. No entanto, na fracção citoplasmática não se detectou a subunidade β da ETF por *western blot*, tanto no doente como nos indivíduos controlo.

2. Análise do perfil proteico mitocondrial obtido por 2DE

De modo a se obter um perfil proteico mitocondrial que permita uma melhor compreensão dos casos moderados de MADD em estudo, procedeu-se à separação das proteínas mitocondriais por electroforese bi-dimensional (IEF/SDS-PAGE).

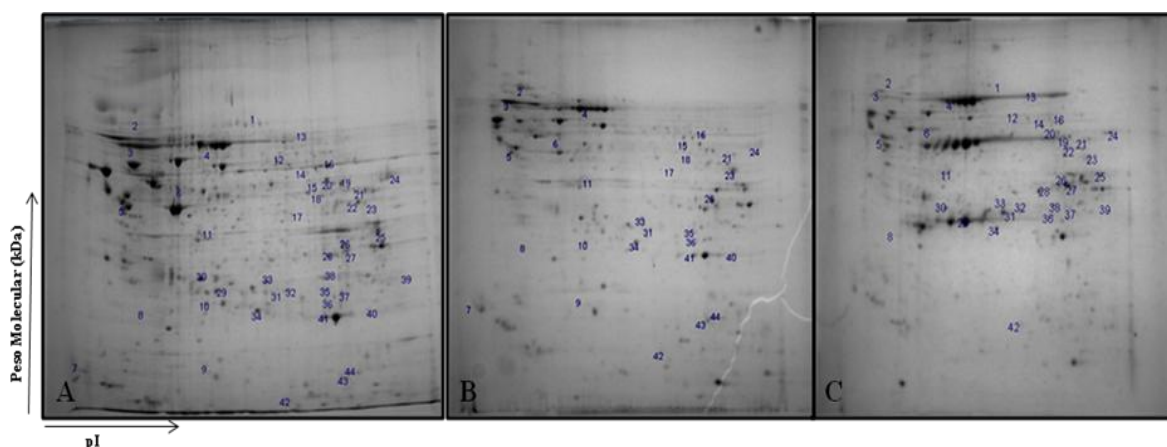


Figura 11 - Imagens representativas dos géis obtidos na separação proteica das fracções mitocondriais dos indivíduos Controlo (A), do Doente 1 (B) e do Doente 2 (C) realizada por electroforese bidimensional. A numeração nas imagens indica os *spots* cujas proteínas se encontram diferentemente expressas em cada um dos casos em estudo e tem correspondência na Tabela 3. (na Figura A.1 do Anexo A é apresentada uma ampliação desta figura).

A análise dos géis 2 DE obtidos, representados na Figura 11, permitiu detectar 482 ± 60 spots na fracção mitocondrial dos indivíduos Controlo, 278 spots no Doente 1 e 271 spots no Doente 2, tendo sido extraídos 333 *spots* de um gel controlo para posterior análise por espectrometria de massa. A partir da análise por MALDI-TOF/TOF foram identificadas positivamente 248 proteínas com um grau de confiança igual ou superior a

95%. Estas proteínas, apresentadas na Tabela B.1 no Anexo B, foram distribuídas em várias classes mediante a sua função biológica recorrendo à ferramenta bioinformática Panther (www.pantherdb.org) e ao GOA (*Gene Ontology Annotation*) (Figura 12), sendo de realçar que “metabolismo” é a classe mais representada (25,4% de acordo com o Panther e 21% segundo a anotação do GOA). Segundo o GOA, 19% das proteínas identificadas são estruturais, 13% são responsáveis pela transdução do sinal, 10% são proteínas responsáveis pela ligação e *folding* de proteínas e 7% são proteínas relacionadas com homeostasia redox da célula. De acordo com a distribuição obtida com o Panther, 16% das proteínas pertencem a processos celulares (tais como a comunicação celular, ciclo celular ou adesão celular) e 7,7% à organização celular (como por exemplo, organização dos organelos e morfogénese dos componentes celulares).

Algumas proteínas foram identificadas em mais do que um *spot*, normalmente em zonas do gel correspondentes a pesos moleculares mais baixos, sugestivo da ocorrência de alguma fragmentação associada à proteólise celular, tendo este fenómeno já sido descrito na literatura [88]. É de salientar a identificação de algumas proteínas em mais do que um *spot* (Tabela B.1, Anexo B), como por exemplo a ATP sintase subunidade β (*spots* 76, 97, 98, 99 e 125) ou a Actina (*spots* 136, 109, 186, 190 e 373). Em vários *spots* foi detectada albumina (*spots* 28, 37, 38, 47, 49, 50, 51 e 52), que no entanto foi excluída da análise pelo facto da sua presença na fracção mitocondrial poder estar associada à utilização de albumina de soro bovino (BSA) no procedimento de isolamento das mitocôndrias (Capítulo IV.4).

Da análise comparativa do perfil observado nos géis 2DE da fracção mitocondrial dos indivíduos controlo com cada um dos doentes analisados, efectuada com o software PdQuest (Bio-Rad), registaram-se variações na expressão de um total de 44 proteínas, 28 para o Doente 1 e 33 para o Doente 2, 17 das quais comuns a ambos os doentes, tais como a *heat shock protein 90* (*spot* 2), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*spot* 11) ou a hidroxiacil-CoA desidrogenase (*spot* 36).

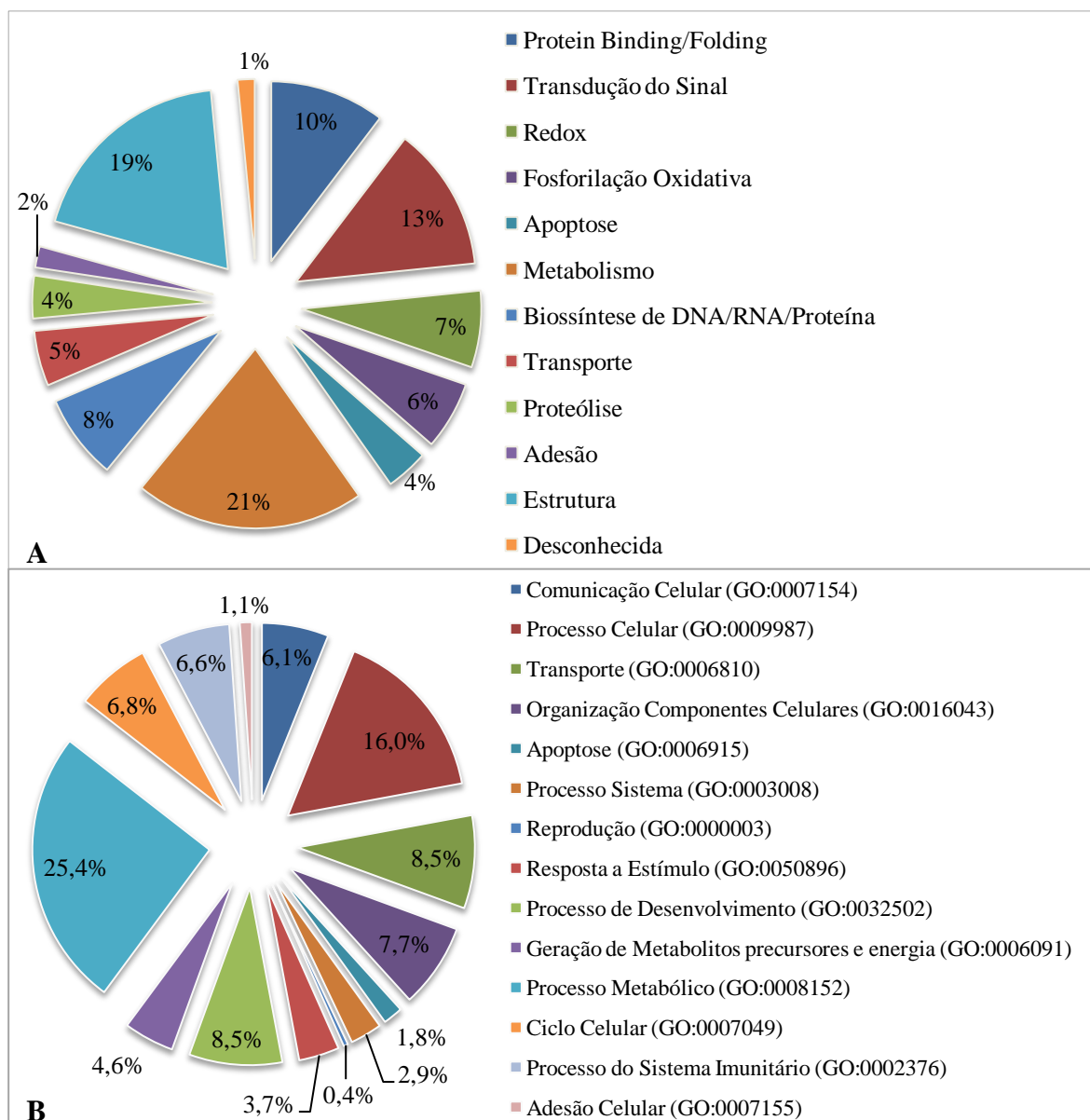


Figura 12 - Distribuição das proteínas mitocondriais identificadas por 2DE-MS/MS considerando a função biológica atribuída pelo GOA (A) e pelo Panther (B).

As proteínas diferentemente expressas foram agrupadas com base na função biológica, recorrendo ao GOA. Das 9 classes funcionais identificadas (Figura 13A) são de destacar as proteínas responsáveis por vários processos metabólicos (48%), processos de oxidação-redução (14%) e de ligação e *folding* de proteínas (11%). Registaram-se ainda alterações da expressão de proteínas envolvidas na transdução de sinal (9%) e associadas à fosforilação oxidativa (7%).

Tabela 3 - Proteínas diferentemente expressas identificadas pela análise comparativa da fracção mitocondrial de cada um dos doentes em estudo com os indivíduos controlo. Os valores assinalados com “+” representam sobreexpressão e com “-” a subexpressão da proteína relativamente ao controlo. O número do *spot* tem correspondência na Figura 11.

<i>Spot</i>	Proteína	Número de Acesso	Peso Molecular	pI	Classe Funcional	Doente 1	Doente 2
1	<i>Mitochondrial inner membrane protein</i>	IMMT_HUMAN	83626.35156	6.08	<i>Protein Binding/Folding</i>	-	-2.05
2	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	HS90B_HUMAN	83212.10156	4.97	<i>Protein Binding/Folding</i>	+60.31	+1.84
3	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSP7C_HUMAN	70854.21875	5.37	<i>Protein Binding/Folding</i>	+26.76	+1.96
4	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>	+2.32	+31.51
5	<i>Reticulocalbin-1</i>	RCN1_HUMAN	38866.16016	4.86	Transdução do Sinal	-2.29	-3.98
6	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>	TXND5_HUMAN	47598.66016	5.63	Redox	-2.32	-2.06
7	<i>Cytochrome b5</i>	CYB5_HUMAN	15320.50977	4.88	Fosforilação Oxidativa	+2.09	-
8	<i>Diablo homolog, mitochondrial</i>	DBLOH_HUMAN	27113.7207	5.68	Apoptose	-1.55	+1.90
9	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5</i>	NDUA5_HUMAN	13450.16992	5.75	Fosforilação Oxidativa	+1.83	-
10	<i>Glutathione S-transferase P</i>	GSTP1_HUMAN	23341.01953	5.43	Redox	+1.58	-
11	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	36030.39844	8.57	Metabolismo	+2.52	+2.58
12	<i>Glutaminase kidney isoform, mitochondrial</i>	GLSK_HUMAN	73413.89844	7.85	Metabolismo	-	-2.66
13	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial</i>	GPDM_HUMAN	80801.60938	7.57	Metabolismo	-	+3.41
14	<i>Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase</i>	AL7A1_HUMAN	55331.46094	6.44	Metabolismo	-	-2.22
15	<i>Alpha-enolase</i>	ENOA_HUMAN	47139.32031	7.01	Metabolismo	+2.09	-
16	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	DHE3_HUMAN	61359.19141	7.66	Metabolismo	-2.20	-2.57
17	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	ACADS_HUMAN	44268.76172	8.13	Metabolismo	-2.05	-
18	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	IDHC_HUMAN	46629.51172	6.53	Metabolismo	+1.51	-

19	<i>Fumarate hydratase, mitochondrial</i>	FUMH_HUMAN	54602.17188	8.85	Metabolismo	–	-1.74
20	<i>Beta-enolase</i>	ENOB_HUMAN	46902.28125	7.59	Metabolismo	–	-2.80
21	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	THIM_HUMAN	41897.64063	8.32	Metabolismo	-1.88	-1.74
22	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	THIL_HUMAN	45170.64063	8.98	Metabolismo	–	-2.11
23	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	ALDOA_HUMAN	39395.30078	8.3	Metabolismo	+11.59	+2.10
24	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	EF1A1_HUMAN	50109.10938	9.1	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína	-26.75	-2.04
25	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	MDHM_HUMAN	35480.73047	8.92	Metabolismo	–	-1.76
26	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	VDAC2_HUMAN	31546.55078	7.49	Transporte	+3.05	+2.19
27	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	GBLP_HUMAN	35054.55859	7.6	Transdução do Sinal	–	-3.19
28	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</i>	ETFA_HUMAN	35057.57813	8.62	Fosforilação Oxidativa	–	-6.21
29	<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_HUMAN	22768.49023	5.98	<i>Protein Binding/Folding</i>	–	+4.47
30	<i>Prohibitin</i>	PHB_HUMAN	29785.90039	5.57	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína	–	-2.06
31	<i>Protein ETHE1, mitochondrial</i>	ETHE1_HUMAN	27855.10938	6.35	Metabolismo	+3.21	+1.73
32	<i>Peroxisredoxin-6</i>	PRDX6_HUMAN	25019.18945	6	Redox	–	+1.80
33	<i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i>	D3D2_HUMAN	32795.23828	8.8	Metabolismo	-1.58	-2.75
34	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	PRDX3_HUMAN	27675.16992	7.67	Redox	+1.55	-2.11
35	<i>Triosephosphate isomerase</i>	TPIS_HUMAN	26652.74023	6.45	Metabolismo	+2.38	–
36	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	HCD2_HUMAN	26906.10938	7.66	Metabolismo	+1.64	-2.98
37	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	PGAM1_HUMAN	28785.83008	6.67	Metabolismo	–	-1.76
38	<i>Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial</i>	KAD4_HUMAN	25252.21094	8.47	Metabolismo	–	-5.15
39	<i>Glutathione S-transferase kappa 1</i>	GSTK1_HUMAN	25480.30078	8.5	Redox	–	+3.65
40	<i>Superoxide dismutase [Mn],</i>	SODM_HUMAN	24706.55078	8.35	Redox	+3.65	–

	<i>mitochondrial</i>						
41	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	PSB2_HUMAN	22821.67969	6.51	Proteólise	+1.62	–
42	<i>Mitogen-activated protein kinase scaffold protein 1</i>	MPKS1_HUMAN	13614.25977	6.73	Transdução do Sinal	+3.12	+2.77
43	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA_HUMAN	18000.88086	7.68	Metabolismo	+6.11	–
44	<i>Cofilin-1</i>	COF1_HUMAN	18490.66016	8.22	Transdução do Sinal	+2.65	–

Na Figura 13B é apresentada a distribuição das proteínas diferentemente expressas observadas no caso específico do Doente 1 por classes funcionais. Neste caso o perfil não se diferencia muito do perfil global obtido da análise de ambos os doentes, observado na Figura 13A, estando a maioria das proteínas diferentemente expressas envolvidas no metabolismo (43%), em reacções de oxidação-redução (14%), transdução do sinal e ligação e *folding* de proteínas (11%). São ainda de realçar as proteínas responsáveis pela fosforilação oxidativa (7%).

No que diz respeito ao Doente 2, a distribuição das 33 proteínas diferentemente expressas por classes é apresentada na Figura 13C. O perfil observado é semelhante ao global (Figura 6A), com o “metabolismo” em maior representação (49%). Adicionalmente, 15% das proteínas pertencem à classe da ligação e *folding* de proteínas, 12% são proteínas responsáveis por reacções de oxidação-redução e 9% são responsáveis pela transdução de sinal.

A análise particular de cada uma das proteínas tendo por base a Tabela 3, evidencia uma diminuição na expressão de proteínas associadas à oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, como é o caso da Tiolase (*spot* 21), da Acil-CoA Desidrogenase de cadeia curta (*spot* 17) ou da Enoil-CoA Isomerase (*spot* 33) no Doente 1. Contrariamente a estes resultados, observou-se uma ligeira sobreexpressão da Hidroxiacil-CoA Desidrogenase (cerca de duas vezes; *spot* 36). Quanto à flavoproteína transportadora de electrões (*spot* 28), proteína que interage directamente com a ETFDH (cujo défice está na origem da MADD neste doente), não se detectaram variações de expressão significativas, o que está de acordo com os resultados obtidos da análise por *western blot* (Figura 14). O Doente 1 apresenta ainda sobreexpressão de várias proteínas relacionadas com o *folding* de proteínas e com o stress celular, tais como várias *chaperones* (HSP 90 subunidade β no *spot* 2, HSP 71 kDa no *spot* 3, Stress Protein 70 no *spot* 4, ou a HSP subunidade β -1 no *spot* 29) e proteínas relacionadas com processos de oxidação-redução, tais como a

glutathione-S-transferase (GST) (*spots* 10 e 39) e a superóxido dismutase (MnSOD) (*spot* 40). Destas proteínas é de salientar os níveis elevados de HSP 90 e HSP 71, mais de 20 vezes comparativamente aos indivíduos controlo. Verificou-se ainda um aumento da expressão de algumas enzimas relacionadas com o metabolismo dos carboidratos, como é exemplo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (2,52 vezes; *spot* 13) ou a frutose-bifosfato aldolase (11,59 vezes; *spot* 23).\

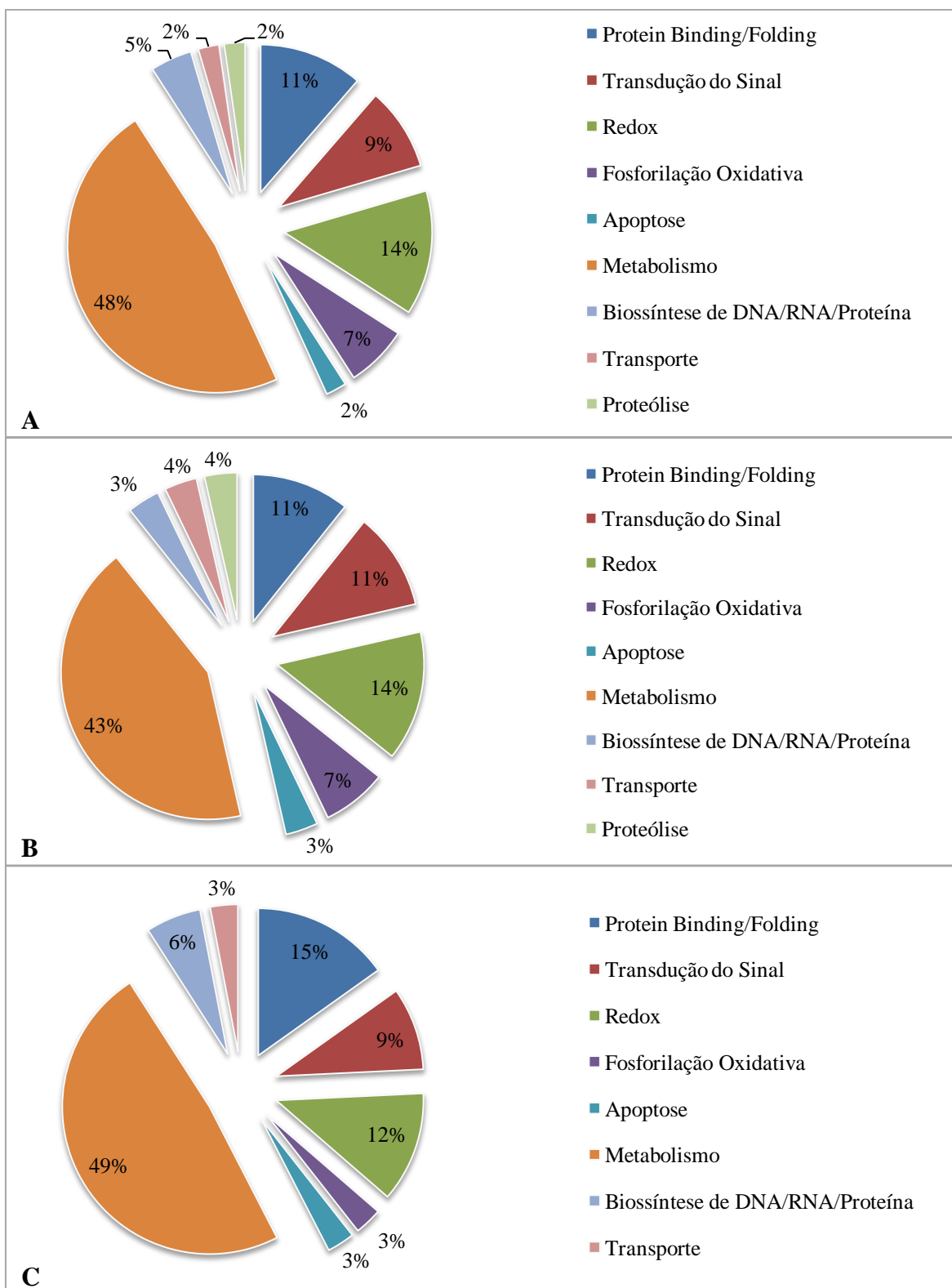


Figura 13 - Distribuição das proteínas diferentemente expressas por classes atendendo à sua função biológica, com base no GOA. Em A é apresentado o perfil global, em B o do Doente 1 e em C do Doente 2.

No Doente 2, observou-se uma subexpressão em aproximadamente 6 vezes da subunidade α da proteína ETF (*spot* 28, Tabela 3) que parece estar associada à subexpressão da subunidade β desta proteína avaliada por *western blot* (Figura 14). Outras proteínas envolvidas na FAO apresentaram também uma expressão diminuída, como é o caso da Tiolase (1,74 vezes; *spot* 21), da Hidroxiacil-CoA Desidrogenase (2,98 vezes; *spot* 36) e da enoil-CoA isomerase (2,75 vezes; *spot* 33).

Para este doente, e à semelhança do verificado para o Doente 1, os resultados evidenciam uma sobreexpressão de várias proteínas relacionadas com o stress e a homeostasia redox celular, tais como de várias *heat shock proteins* (*spots* 2, 3, 4, 29) ou da GST (*spot* 39). O aumento da expressão de enzimas do metabolismo dos carboidratos, como GAPDH (*spot* 11) e a frutose-bifosfato aldolase (*spot* 23) também foi observado, muito embora os níveis da enzima malato desidrogenase (1,76 vezes; *spot* 25) se encontrassem diminuídos.

3. Análise da expressão de proteínas mitocondriais por *Western Blot*

Para validar os resultados obtidos por 2DE, procedeu-se à análise da expressão de proteínas como a ETFDH, a subunidade β da ETF, a GAPDH e a subunidade β da ATP sintase. Na Figura 14 é apresentada a variação da expressão da proteína ETF, subunidade β para o Doente 1 e da proteína ETFDH para o Doente 2, no sentido de complementar os resultados já apresentados nas Figuras 9 e 10.

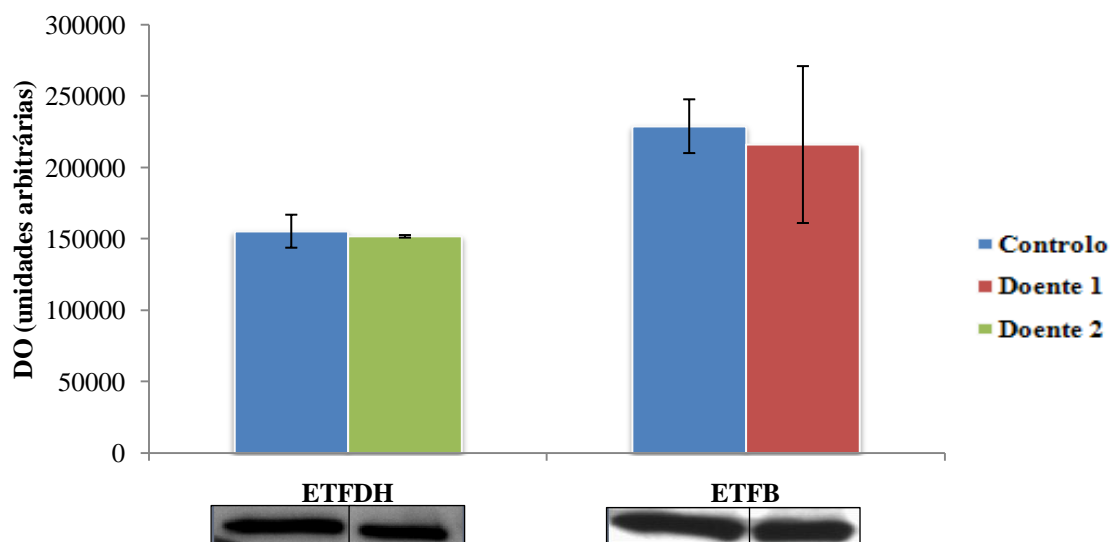


Figura 14 - Variação da expressão mitocondrial das ETFDH e ETF, subunidade β , avaliada por *western blot* nas fracções mitocondriais dos indivíduos controlo e Doente 1 (para a ETFB) e Doente 2 (para a ETFDH). Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *western blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Da análise da Figura 14 é possível verificar que não existe variação significativa do teor mitocondrial da subunidade β da proteína ETF no caso do Doente 1, assim como da ETFDH no caso do Doente 2. Estes resultados, no que diz respeito ao Doente 1, corroboram os dados obtidos a partir da análise comparativa dos géis 2DE efectuada com o *software* PdQuest (Tabela 3 *spot* 28).

Avaliou-se ainda a expressão das proteínas da ATP sintase, subunidade β , e da GAPDH (Figura 15).

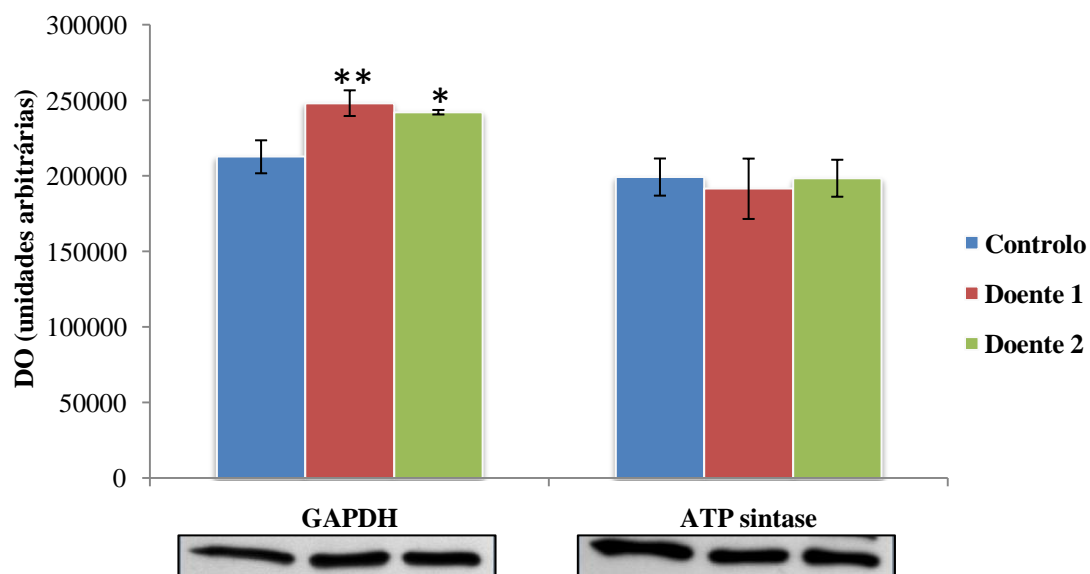


Figura 15 - Variação da expressão mitocondrial das proteínas subunidade β da ATP sintase e GAPDH avaliada por *western blot* nas amostras dos indivíduos controlo, Doente 1 e Doente 2. Sob o gráfico é apresentada uma imagem representativa do *western blot*. Os valores (média \pm desvio padrão) são expressos em unidades arbitrárias de densidade óptica (DO). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Os resultados apresentados na Figura 15 evidenciam um aumento significativo da expressão mitocondrial da proteína GAPDH para ambos os doentes em estudo, o que corrobora os resultados apresentados da Tabela 1.

Relativamente à proteína ATP sintase, subunidade β , não se verificaram variações significativas da expressão entre os indivíduos controlo e os doentes em estudo, o que está de acordo com os resultados obtidos da análise comparativa dos géis 2DE efectuada com o software PdQuest (Bio-Rad).

VI - Discussão

No âmbito desta dissertação foi realizado um estudo baseado numa abordagem proteómica que utiliza a espectrometria de massa e *immunoblotting* de modo a caracterizar o proteoma mitocondrial de fibroblastos de dois pacientes com formas moderadas de MADD.

Os fibroblastos são normalmente utilizados para efeitos de diagnóstico por análise da actividade enzimática mitocondrial e para detecção de défices de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial [67]. Estas células são úteis para o estudo de doenças em humanos por se poderem obter a partir de uma pequena biopsia de pele do indivíduo em análise, e muito embora não se detectem alterações nestas células que sejam específicas de outros tecidos, os fibroblastos constituem bons modelos para estudos bioquímicos de doenças [91].

Embora ambos os pacientes em estudo tenham sido diagnosticados com a mesma patologia, MADD do tipo III, a mutação genética subjacente a cada um deles é distinta, sendo que o Doente 1 apresenta uma mutação no gene *ETFDH* e o Doente 2 no gene *ETFB*. O Doente 1 apresenta uma mutação *missense* em homozigotia que leva à substituição de uma prolina por uma leucina na posição 534 da proteína ETFDH (Figura 8A). Por sua vez, o Doente 2 apresenta uma mutação *missense* em homozigotia que origina a substituição da arginina 191 por uma cisteína na subunidade β da proteína ETF (Figura 8B).

A mutação apresentada pelo Doente 1 já havia sido reportada num estudo de 2010 de Wolf *et al.* [92] e está associada à mutação c.C1601T, que leva à substituição de uma prolina que muito embora não se encontre numa zona com estrutura secundária definida, está localizada no domínio do *cluster* 4Fe4S (Figura 8A), que tem sido descrito como correspondendo à região do terminal carboxílico da proteína que compreende cerca de 140 aminoácidos [65]. Esta mutação está associada a um quadro clínico moderado, sendo que actualmente o paciente não apresenta qualquer sintoma da doença. Na pesquisa da proteína por *western blot*, esta não foi detectada na fracção mitocondrial (Figura 9) sendo de esperar que este resultado estivesse relacionado com sintomatologia muito severa [93]. Este facto sugere que a alteração do *folding* da ETFDH activa o sistema de controlo qualidade mitocondrial, que culmina na degradação da proteína. É de salientar que este doente responde a um tratamento com suplemento de riboflavina, cujo efeito não foi analisado neste estudo. Efectivamente, não houve suplementação com riboflavina no meio de cultura

celular dos fibroblastos pelo que o seu efeito no *folding* da proteína não foi avaliado. Muito embora não exista ainda consenso acerca dos mecanismos subjacentes à resposta de doentes MADD a este tratamento, tem sido sugerido que o FAD possa actuar sobre o *folding* das flavoproteínas, permitindo que proteínas com alterações conformacionais possam ter a sua conformação melhorada na presença de FAD [94, 95]. Deste modo, a avaliação do efeito da riboflavina no proteoma mitocondrial do Doente 1 deverá ser considerada em trabalhos futuros.

Um estudo mais antigo descreve uma mutação que leva à perda de uma zona da ETFDH neste domínio do *cluster* 4Fe4S com consequente perda da sua função de ubiquinona oxidoreductase, embora com manutenção da capacidade em receber electrões provenientes da ETF [96]. No entanto, outros estudos sugerem que a UQ é reduzida pelo FADH₂ da ETFDH e não pelo *cluster* 4Fe4S [30]. Usselman *et al.* mediram a actividade da proteína ETFDH depois de induzidas mutações pontuais com consequente troca de aminoácidos localizados no domínio do *cluster* e reportaram uma diminuição da actividade deste sem alterações na actividade do domínio FAD [97]. Tendo por base estes trabalhos, é de prever que a mutação apresentada pelo Doente 1 esteja associada ao comprometimento da actividade catalítica da enzima. No estudo de Wolf *et al.* já referido é colocada ainda a hipótese de que a alteração da conformação da proteína se dê no local onde ocorre a interacção com a ETF o que poderá também dificultar a passagem de equivalentes reduzidos entre estas proteínas, muito embora nenhuma evidência experimental tenha sido apresentada [92].

O Doente 2 apresenta também uma mutação já reportada por Schiff *et al.* em 2006 [22], e que resulta da substituição c.C571T no ADN que codifica a subunidade β da proteína ETF. Esta mutação leva à substituição do aminoácido 191 da proteína que se encontra no domínio III da proteína mas que não apresenta uma estrutura secundária definida (Figura 8). A substituição de uma arginina conservada por uma cisteína, sendo o primeiro um aminoácido polar básico e o segundo polar sem carga, altera a polaridade no local da substituição, podendo originar alterações conformacionais na proteína, à semelhança do observado para uma mutação na SCAD com substituição de uma arginina por cisteína [15, 64]. No estudo de Schiff *et al.* foi avaliada a actividade da flavoproteína

tendo-se verificado uma actividade de 6% da ETF “mutada” quando comparada com os controlos [22]. Muito embora a alteração de aminoácidos na ETF do Doente 2 não se encontre no domínio de ligação ao cofactor FAD, estudos prévios sugerem que alterações conformacionais em qualquer local da proteína podem levar a um rearranjo conformacional do domínio FAD com diminuição das interacções com o FAD e consequentemente, comprometendo a actividade da proteína [94].

Este doente, tal como o primeiro, apresenta um quadro clínico moderado, e quando analisada a expressão da subunidade β da ETF por *western blot* verificou-se uma diminuição significativa da mesma tanto na fracção mitocondrial como na fracção nuclear, confirmando assim o défice desta proteína no Doente 2 (Figura 10).

Alguns estudos têm sugerido que proteínas com alterações conformacionais possam estar ligadas a distúrbios da função mitocondrial [15, 64]. Deste modo a adaptação do proteoma mitocondrial dos fibroblastos dos doentes com MADD em estudo foi avaliada, tendo-se precedido à separação das proteínas mitocondriais por electroforese bi-dimensional seguida da identificação das mesmas por espectometria de massa. Com esta abordagem foram identificadas positivamente 248 proteínas (Tabela B-1 Anexo B) de diferentes classes funcionais (Figura 12), um valor consideravelmente superior ao obtido em outros estudos que analisaram a fracção mitocondrial de fibroblastos [67, 91].

De modo a avaliar quais as consequências a nível da expressão das proteínas que interagem directamente com a proteína alterada, realizou-se uma análise por *western blot* da proteína ETF para o Doente 1 e ETFDH para o Doente 2 (Figura 14), não se registando alterações significativas na expressão destas proteínas. No que diz respeito à mutação no gene *ETFDH*, um estudo realizado anteriormente para um doente com uma forma grave de MADD relata a diminuição acentuada da expressão da proteína ETF assim como de outras flavoproteínas associadas ao processo da FAO [93]. No entanto, no Doente 1 não se observou uma diminuição dos níveis mitocondriais da ETF, embora por análise comparativa do perfil 2DE se tenha registado a diminuição da expressão da SCAD (*spot* 17, Tabela 3). Estes resultados sugerem que neste caso moderado de MADD possam existir ligeiras variações da expressão de algumas flavoproteínas, tendo-se registado apenas a subexpressão da SCAD. No Doente 2, um caso moderado de MADD por défice de ETF, não se observaram alterações na expressão de ETFDH (Figura 14) nem de SCAD

(2DE), o que sugere que a mutação no gene *ETFB* não está associada a alterações na expressão de outras flavoproteínas envolvidas no processo da FAO. Na análise comparativa do perfil mitocondrial obtido por 2DE do Doente 2 foi possível detectar uma diminuição de cerca de 6 vezes da subunidade α da ETF sugerindo que o défice da subunidade β do Doente 2 possa também estar associado a um défice na subunidade α da mesma proteína. Este resultado está de acordo com outros estudos que analisaram mutações no gene *ETFB* e verificaram a desestabilização da subunidade α da ETF em consequência do défice da subunidade β da ETF [25, 84], embora esta consequência fenotípica não se observe em todas as mutações descritas neste gene [13].

Da análise comparativa do perfil mitocondrial destes doentes com indivíduos controlo foram detectadas 44 proteínas que apresentaram diferenças de expressão significativas, distribuídas por um total de 9 classes funcionais atribuídas pelo GOA (Tabela 3 e Figura 13), dando-se especial relevância a classes “*protein binding/folding*” (11%) ou “metabolismo” (48%). Os resultados obtidos sugerem uma adaptação metabólica mitocondrial com alteração da expressão de algumas das enzimas envolvidas na β -oxidação, como a tiolase (*spot* 21, Tabela 3) e a 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (*spot* 33, Tabela 3) que se encontram subexpressas em ambos os casos de MADD em análise, ou da SCAD (*spot* 17, Tabela 3) subexpressa no caso do Doente 1 e da subunidade α da ETF (*spot* 28, Tabela 3) e da hidroxiacil-CoA desidrogenase (*spot* 36, Tabela 3) subexpressas no caso do Doente 2. A subexpressão de algumas destas enzimas já havia sido reportada num caso de MADD grave [93]. Das proteínas diferentemente expressas pertencentes à classe funcional *protein binding/folding* é de salientar as *chaperones Stress-70 protein*, a *Heat shock cognate 71kDa protein* pertencentes à família das Hsp70, bem como a *Heat shock protein 90- β* , pertencente à família das Hsp90, que se encontraram sobreexpressas em ambos os doentes, em alguns dos casos em mais de 20 vezes comparativamente com o controlo. No Doente 2 observou-se ainda a sobreexpressão da *Heat shock protein β -1* da família das HSP20. Esta sobreexpressão de *chaperones* em ambos os doentes sugere que perante o défice ETFDH ou da ETF é activado na célula o sistema de controlo de qualidade das proteínas (PQC – *Protein Quality Control*), sendo as *chaperones* responsáveis pela primeira linha de defesa, monitorizando o *folding* e *assembly* das proteínas mitocondriais, eliminando as proteínas alteradas e que se encontram em excesso [98, 99]. As *Heat Shock Protein* da família Hsp70 são responsáveis pela estabilização de proteínas com alterações

conformacionais, evitam que estas se agreguem ao mediar a dissolução dos agregados de proteínas [98]. As *small Hsp* são proteínas que actuam como *chaperones* e cuja sobreexpressão já foi relatada em situações de stress celular, estando associadas à eliminação de agregados proteicos bem como ao *refolding* de proteínas [100, 101]. Tal como as Hsp70 e as Hsp20, a família das Hsp90 actuam sobre o *folding* das proteínas de modo a manter a integridade estrutural e função das mesmas [102].

Os níveis exacerbados de Hsp90- β (60 vezes) e Hsp7C (26 vezes) observados no Doente 1 (Tabela 3) corroboram a hipótese de que a ausência da ETFDH na fracção mitocondrial (Figura 9) é devida à eliminação desta por intervenção do sistema de controlo de qualidade mitocondrial ao qual pertencem as referidas *chaperones* [98, 99].

A comparação do perfil proteico mitocondrial evidencia ainda alterações da expressão de proteínas envolvidas em reacções de oxidação-redução (14% para o Doente 1 e 12% para o Doente 2, Figura 13), das quais são de realçar as enzimas antioxidantes mitocondrias, como a GST observada em ambos os casos, a MnSOD (Doente 1) e a *peroxiredoxin-6* (Doente 2) (Tabela 3). A família das *peroxiredoxin* foi recentemente caracterizada como tendo acção antioxidante. O aumento da sua expressão tem sido relacionado com o aumento do stress oxidativo, estando associada à reparação de membranas com danos oxidativos [103]. O aumento da expressão de glutathione S-transferase e da superóxido dismutase há muito que tem sido relacionado com o aumento de danos celulares resultantes de stress oxidativo [104, 105]. O aumento de algumas destas enzimas antioxidantes foi também registado em estudos de défices da FAO, nomeadamente num estudo proteómico de um caso grave de MADD [93], e num estudo do défice da SCAD [15].

Alterações a nível do metabolismo mitocondrial, como por exemplo na via metabólica da β -oxidação, têm vindo a ser associadas ao aumento da produção de ROS que podem ser produzidos pelo sistema ETF/ETFDH, por outras desidrogenases do processo ou ainda em consequência da incapacidade de canalizar os equivalentes reduzidos para a cadeia transportadora de electrões [99, 106]. Deste modo o défice das proteínas (ETFDH e ETF) registado nos doentes em estudo pode estar na origem de uma maior produção de ROS induzindo a activação dos sistemas antioxidantes da mitocôndria.

Muito embora o declínio da produção de energia pela fosforilação oxidativa e o aumento da produção de ATP pela glicólise tenha vindo a ser reportado em estudos de

défices proteicos da via da β -oxidação mitocondrial [15, 93, 107] não foram encontradas nos doentes em estudo evidências do decréscimo de produção de ATP via fosforilação oxidativa.

A análise comparativa do perfil 2DE da fracção mitocondrial dos doentes em estudo com indivíduos controlo evidenciou a sobreexpressão da enzima GAPDH (*spot* 11, Tabela 3), posteriormente confirmada por *immunoblotting* (Figura 15). Embora a GAPDH seja classicamente descrita como uma enzima glicolítica, estudos recentes têm registado um aumento dos níveis de GAPDH na mitocôndria em condições de stress [108, 109]. Estudos recentes demonstram que os inibidores dos complexos da ETC induzem a sobreexpressão da GAPDH dando origem à sua acumulação na mitocôndria [108]. Estes estudos sugerem ainda a associação da GAPDH à apoptose, promovida pela interacção de agregados desta proteína com a proteína da membrana mitocondrial VDAC1 (*Voltage-dependent anion-selective channel 1*), com consequente aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial [109, 110]. Estes resultados foram ainda suportados pela sobreexpressão de outras proteínas relacionadas com a apoptose, como é exemplo a *DIABLO homolog protein* aumentada no caso do Doente 2 ou do canal VDAC2 aumentado em ambos os doentes. A *DIABLO homolog protein* está associada à activação da via apoptótica das caspases [111, 112]. O canal VDAC interage com proteínas ligadas à activação da apoptose, para além da GAPDH, mediando a libertação do citocromo c para o citoplasma [113]. Uma outra proteína identificada com actividade apoptótica é a *Prohibitin*, que quando subexpressa na mitocôndria induz o processo de envelhecimento celular [114, 115]. No presente estudo observou-se uma subexpressão da *Prohibitin* no Doente 2.

De um modo geral, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que em formas moderadas de MADD a mitocôndria adapta-se alterando a expressão de enzimas metabólicas e aumentando a expressão de proteínas responsáveis pela manutenção da homeostasia redox celular, da qualidade funcional das proteínas mitocondriais e pela activação da apoptose.

VII - Conclusão

Com o intuito de avaliar as consequências de défices moderados de MADD no proteoma mitocondrial, relacionando-as com as alterações genéticas subjacentes, no presente estudo analisaram-se dois doentes com MADD do tipo III, em que o Doente 1 apresentava um défice da proteína ETFDH resultante de uma mutação *missense* no gene *ETFDH* (p.P534L/ P534L), e o Doente 2 um défice de ETF resultante de uma mutação *missense* no gene *ETF* (p.R191C/R191C). Os resultados obtidos permitiram tirar as seguintes conclusões:

- (i) O Doente 1 apresenta uma mutação que leva à alteração da proteína ETFDH, com comprometimento do seu *folding* e da sua presença na mitocôndria, induzindo uma adaptação mitocondrial a este défice por alteração da expressão de proteínas pertencentes a diferentes *clusters* funcionais;
- (ii) O Doente 2 apresenta uma diminuição significativa da expressão da proteína ETF, tanto da subunidade β onde ocorre a substituição derivada da mutação no gene *ETFB* como na subunidade α , associada ainda a uma adaptação do proteoma mitocondrial a este défice;
- (iii) Os défices mitocondriais de ETFDH e ETF levaram a um aumento da expressão de proteínas do sistema de controlo de qualidade proteica (PQC), sendo de salientar as *chaperones*, nomeadamente da família das Hsp70, Hsp90 e Hsp20;
- (iv) A MADD tipo III apresentada pelos doentes analisados está associada a um aumento do stress oxidativo na mitocôndria, evidenciado pelo aumento da expressão de proteínas antioxidantes como a glutathione S-transferase, a superóxido dismutase e a *peroxiredoxin-6*;
- (v) Os níveis de algumas proteínas mitocondriais relacionadas com a apoptose encontram-se alterados, especialmente para o Doente 2, possivelmente em resposta ao stress a que a mitocôndria se encontra sujeita. Destas destacam-se os níveis aumentados de proteínas como a GAPDH e a porina VDAC2 e os níveis diminuídos da proteína *prohibitin*;

Com este estudo foi possível compreender que os défices moderados de MADD analisados induzem uma adaptação mitocondrial em resposta ao elevado stress oxidativo subjacente, evidenciado pelo aumento da expressão de proteínas de defesa do PQC e

apoptóticas, no entanto não se verifica uma disfunção mitocondrial tão acentuada como o detectado em défices mais graves de MADD.

VIII - Referências Bibliográficas

1. Eaton, S., *Control of mitochondrial beta-oxidation flux*. Progress in Lipid Research, 2002. **41**(3): p. 197-239.
2. Vockley, J. and Whiteman, D.A.H., *Defects of mitochondrial beta-oxidation: a growing group of disorders*. Neuromuscular Disorders, 2002. **12**(3): p. 235-246.
3. Vilarinho, L., Rocha, H., Sousa, C., Marcão, A., Fonseca, H., Bogas, M., and Osório, R., *Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2010: p. 1-6.
4. Osório, R.V. and Vilarinho, L. *Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - Relatório de 2009*. Setembro 2010 Accessed in: Junho 2011]; Available from: http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Documents/2010/Outubro/PNDP_Relatorio2009.pdf.
5. Gregersen, N., Bross, P., and Andresen, B.S., *Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(3): p. 470-82.
6. Gregersen, N., Andresen, B., Pedersen, C., Olsen, R., Corydon, T., and Bross, P., *Mitochondrial fatty acid oxidation defects—remaining challenges*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2008. **31**(5): p. 643-657.
7. Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M., *Mammalian mitochondrial beta-oxidation*. Biochemical Journal, 1996. **320** (Pt 2): p. 345-57.
8. Nelson, D.L. and Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. fourth ed. 2005: W. H. Freeman.
9. Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W., *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. 2nd Edition ed, ed. I. John Wiley & Sons. 2006, Hoboken (NJ).
10. Kompare, M. and Rizzo, W.B., *Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders*. Semin Pediatr Neurol, 2008. **15**(3): p. 140-9.
11. Bartlett, K. and Eaton, S., *Mitochondrial beta-oxidation*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(3): p. 462-9.
12. Jackson, S., Kler, R.S., Bartlett, K., Briggs, H., Bindoff, L.A., Pourfarzam, M., Gardner-Medwin, D., and Turnbull, D.M., *Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation*. The Journal of Clinical Investigation, 1992. **90**(4): p. 1219-1225.
13. Gregersen, N. and Olsen, R., *Disease mechanisms and protein structures in fatty acid oxidation defects*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2010. **33**(5): p. 547-553.
14. Goodman, S.I., Axtell, K.M., Bindoff, L.A., Beard, S.E., Gill, R.E., and Freman, F.E., *Molecular-cloning and expression of a cDNA-encoding human electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase*. European Journal of Biochemistry, 1994. **219**(1-2): p. 277-286.
15. Schmidt, S.P., Corydon, T.J., Pedersen, C.B., Vang, S., Palmfeldt, J., Stenbroen, V., Wanders, R.J., Ruiter, J.P., and Gregersen, N., *Toxic response caused by a misfolding variant of the mitochondrial protein short-chain acyl-CoA dehydrogenase*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2010.
16. Paulson, D.J., Ward, K.M., and Shug, A.L., *Malonyl CoA inhibition of carnitine palmityltransferase in rat heart mitochondria*. FEBS Letters, 1984. **176**(2): p. 381-384.
17. Gropper, S.S., Smith, J.L., and Groff, J.L., *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 5th Edition ed. 2009: Wadsworth Cengage Learning.

18. Nouws, J., Nijtmans, L., Houten, S.M., van den Brand, M., Huynen, M., Venselaar, H., Hoefs, S., Gloerich, J., Kronick, J., Hutchin, T., Willems, P., Rodenburg, R., Wanders, R., van den Heuvel, L., Smeitink, J., and Vogel, R.O., *Acyl-CoA Dehydrogenase 9 Is Required for the Biogenesis of Oxidative Phosphorylation Complex I*. Cell Metabolism, 2010. **12**(3): p. 283-294.
19. He, M., Pei, Z., Mohsen, A.-W., Watkins, P., Murdoch, G., Van Veldhoven, P.P., Ensenauer, R., and Vockley, J., *Identification and characterization of new long chain Acyl-CoA dehydrogenases*. Molecular Genetics and Metabolism, 2011. **102**(4): p. 418-429.
20. Crane, F.L. and Beinert, H., *On the Mechanism of Dehydrogenation of Fatty Acyl Derivatives of Coenzyme A*. Journal of Biological Chemistry, 1956. **218**(2): p. 717-731.
21. Roberts, D.L., Frerman, F.E., and Kim, J.-J.P., *Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(25): p. 14355-14360.
22. Schiff, M., Froissart, R., Olsen, R.K.J., Acquaviva, C., and Vianey-Saban, C., *Electron transfer flavoprotein deficiency: Functional and molecular aspects*. Molecular Genetics and Metabolism, 2006. **88**(2): p. 153-158.
23. *P38117 (ETFB_HUMAN)*. Accessed in: Junho 2011]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P38117>.
24. *P13804 (ETFA_HUMAN)*. Accessed in: Junho 2011]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P13804>.
25. Olsen, R.K.J., Andresen, B.S., Christensen, E., Bross, P., Skovby, F., and Gregersen, N., *Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple Acyl-CoA dehydrogenation deficiency*. Human Mutation, 2003. **22**(1): p. 12-23.
26. Chohan, K.K., Jones, M., Grossmann, J.G., Frerman, F.E., Scrutton, N.S., and Sutcliffe, M.J., *Protein dynamics enhance electronic coupling in Electron Transfer Complexes*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(36): p. 34142-34147.
27. Salazar, D., Zhang, L., Degala, G.D., and Frerman, F.E., *Expression and Characterization of Two Pathogenic Mutations in Human Electron Transfer Flavoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(42): p. 26425-26433.
28. Simkovic, M., Degala, G.D., Eaton, S.S., and Frerman, F.E., *Expression of human electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase from a baculovirus vector: kinetic and spectral characterization of the human protein*. Vol. 364. 2002. 659-67.
29. Parker, A. and Engel, P.C., *Preliminary evidence for the existence of specific functional assemblies between enzymes of the beta-oxidation pathway and the respiratory chain*. Biochemical Journal, 2000. **345**(3): p. 429-435.
30. Zhang, J., Frerman, F.E., and Kim, J.J.P., *Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(44): p. 16212-16217.
31. Olsen, R.K.J., Olpin, S.E., Andresen, B.S., Miedzybrodzka, Z.H., Pourfarzam, M., Merinero, B., Frerman, F.E., Beresford, M.W., Dean, J.C.S., Cornelius, N., Andersen, O., Oldfors, A., Elisabeth, H., Gregersen, N., Turnbull, D.M., and Morris, A.A.M., *ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency*. Brain, 2007. **130**: p. 2045-2054.

32. Ruzicka, F.J. and Beinert, H., *A new membrane iron-sulfur flavoprotein of the mitochondrial electron transfer system the entrance point of the fatty acyl dehydrogenation pathway?* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1975. **66**(2): p. 622-631.
33. Uniprot - Q16134 (ETFD_HUMAN). Accessed in: Junho 2011]; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q16134>.
34. Goodman, S.I., Binard, R.J., Woontner, M.R., and Frerman, F.E., *Glutaric acidemia type II: gene structure and mutations of the electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) gene*. Molecular Genetics and Metabolism, 2002. **77**(1-2): p. 86-90.
35. Frerman, F.E. and Goodman, S.I., *Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(13): p. 4517-4520.
36. den Boer, M.E.J., Wanders, R.J.A., Morris, A.A.M., Ijlst, L., Heymans, H.S.A., and Wijburg, F.A., *Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency: Clinical Presentation and Follow-Up of 50 Patients*. Pediatrics, 2002. **109**(1): p. 99-104.
37. Ijlst, L., Wanders, R.J.A., Ushikubo, S., Kamijo, T., and Hashimoto, T., *Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the [alpha]-subunit of the mitochondrial trifunctional protein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1994. **1215**(3): p. 347-350.
38. den Boer, M.E.J., Dionisi-Vici, C., Chakrapani, A., van Thuijl, A.O.J., Wanders, R.J.A., and Wijburg, F.A., *Mitochondrial trifunctional protein deficiency: A severe fatty acid oxidation disorder with cardiac and neurologic involvement*. The Journal of Pediatrics, 2003. **142**(6): p. 684-689.
39. Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A.W., and Bartlett, K., *The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon?* Biochemistry Society Transactions, 2000. **28**(2): p. 177-82.
40. Parker, A. and Engel, P.C., *Preliminary evidence for the existence of specific functional assemblies between enzymes of the beta-oxidation pathway and the respiratory chain*. Biochemical Journal, 2000. **345**: p. 429-435.
41. Pollitt, R.J., *Disorders of mitochondrial long-chain fatty-acid oxidation*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 1995. **18**(4): p. 473-490.
42. Nada, M.A., Rhead, W.J., Sprecher, H., Schulz, H., and Roe, C.R., *Evidence for intermediate channeling in mitochondrial beta-oxidation*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(2): p. 530-535.
43. Hoffmann, G.F., Zschocke, J., and Nyhan, W.N., *Inherited Metabolic Diseases*. 2010: Springer.
44. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-867.
45. Galton, D.J., *Molecular Genetics of Common Metabolic Disease*. 1985: Edward Arnold Publishers Ltd.
46. Clarke, J.T.R., *A Clinical Guide to the Inherited Metabolic Diseases*. 3rd Edition ed. 2006: Cambridge University Press.

47. Folling, A., *The separation of phenylpyruvic acid in urine as a metabolism anomaly in connection with imbecillitate*. Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie, 1934. **227**: p. 169-176.
48. *An Introduction to Paediatric Pharmaceutical Care*. 2010.
49. Sperl, W., *Clinical-features suggestive of inherited metabolic disorders*. Wiener Klinische Wochenschrift, 1992. **104**(16): p. 497-502.
50. Holton, J.B., Allen, J.T., Green, C.A., Partington, S., Gilbert, R.E., and Berry, P.J., *Inherited metabolic diseases in the sudden-infant-death-syndrome*. Archives of Disease in Childhood, 1991. **66**(11): p. 1315-1317.
51. Kelley, R.I., *Inborn errors of sterol biosynthesis*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2001. **2**: p. 299-341.
52. Zytkevicz, T.H., Fitzgerald, E.F., Marsden, D., Larson, C.A., Shih, V.E., Johnson, D.M., Strauss, A.W., Comeau, A.M., Eaton, R.B., and Grady, G.F., *Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England newborn screening program*. Clinical Chemistry, 2001. **47**(11): p. 1945-1955.
53. Millington, D.S., *Newborn screening for metabolic diseases*. American Scientist, 2002. **90**(1): p. 40-47.
54. Shekhawat, P.S., Matern, D., and Strauss, A.W., *Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: Impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management*. Pediatric Research, 2005. **57**(5): p. 78R-86R.
55. Bouchireb, K., Teychene, A.-M., Rigal, O., de Lonlay, P., Valayannopoulos, V., Gaudelus, J., Sellier, N., Bonnefont, J.P., Brivet, M., and de Pontual, L., *Post-mortem MRI reveals CPT2 deficiency after sudden infant death*. European Journal of Pediatrics, 2010. **169**(12): p. 1561-3.
56. DiMauro, S. and DiMauro, P.M., *Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria*. Science, 1973. **182**(115): p. 929-31.
57. Andresen, B.S., Olpin, S., Poorthuis, B.J.H.M., Scholte, H.R., Vianey-Saban, C., Wanders, R., Ijlst, L., Morris, A., Pourfarzam, M., Bartlett, K., Baumgartner, E.R., deKlerk, J.B.C., Schroeder, L.D., Corydon, T.J., Lund, H., Winter, V., Bross, P., Bolund, L., and Gregersen, N., *Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. American Journal of Human Genetics, 1999. **64**(2): p. 479-494.
58. Gregersen, N., Andresen, B.S., Corydon, M., Corydon, T.J., Olsen, R.K.J., Bolund, L., and Bross, P., *Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship*. Human Mutation, 2001. **18**(3): p. 169-189.
59. Andresen, B.S., Dobrowolski, S.F., O'Reilly, L., Muenzer, J., McCandless, S.E., Frazier, D.M., Udvari, S., Bross, P., Knudsen, I., Banas, R., Chace, D.H., Engel, P., Naylor, E.W., and Gregersen, N., *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency*. American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(6): p. 1408-18.
60. Pedersen, C.B., Kolvraa, S., Kolvraa, A., Stenbroen, V., Kjeldsen, M., Ensenaer, R., Tein, I., Matern, D., Rinaldo, P., Vianey-Saban, C., Ribes, A., Lehnert, W., Christensen, E., Corydon, T.J., Andresen, B.S., Vang, S., Bolund, L., Vockley, J.,

- Bross, P., and Gregersen, N., *The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level*. Human Genetics, 2008. **124**(1): p. 43-56.
61. Dessein, A.-F., Fontaine, M., Andresen, B., Gregersen, N., Brivet, M., Rabier, D., Napuri-Gouel, S., Dobbelaere, D., Mention-Mulliez, K., Martin-Ponthieu, A., Briand, G., Millington, D., Vianey-Saban, C., Wanders, R., and Vamecq, J., *A novel mutation of the ACADM gene (c.145C>G) associated with the common c.985A>G mutation on the other ACADM allele causes mild MCAD deficiency: a case report*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2010. **5**(1): p. 26.
62. Andresen, B.S., Bross, P., Udvari, S., Kirk, J., Gray, G., Kmoch, S., Chamoles, N., Knudsen, I., Winter, V., Wilcken, B., Yokota, I., Hart, K., Packman, S., Harpey, J.P., Saudubray, J.M., Hale, D.E., Bolund, L., Kølvrå, S., and Gregersen, N., *The Molecular Basis of Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) Deficiency in Compound Heterozygous Patients: Is There Correlation between Genotype and Phenotype?* Human Molecular Genetics, 1997. **6**(5): p. 695-707.
63. Pedersen, C.B., Bross, P., Winter, V.S., Corydon, T.J., Bolund, L., Bartlett, K., Vockley, J., and Gregersen, N., *Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins. The molecular pathogenesis of short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(48): p. 47449-58.
64. Schmidt, S.P., Corydon, T.J., Pedersen, C.B., Bross, P., and Gregersen, N., *Misfolding of short-chain acyl-CoA dehydrogenase leads to mitochondrial fission and oxidative stress*. Molecular Genetics and Metabolism, 2010. **100**(2): p. 155-62.
65. Watmough, N.J. and Frerman, F.E., *The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2010. **1797**(12): p. 1910-1916.
66. Bross, P., Jespersen, C., Jensen, T.G., Andresen, B.S., Kristensen, M.J., Winter, V., Nandy, A., Kräutle, F., Ghisla, S., Bolund, L., Kim, J.-J.P., and Gregersen, N., *Effects of Two Mutations Detected in Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD)-deficient Patients on Folding, Oligomer Assembly, and Stability of MCAD Enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(17): p. 10284-10290.
67. Palmfeldt, J., Vang, S., Stenbroen, V., Pedersen, C.B., Christensen, J.H., Bross, P., and Gregersen, N., *Mitochondrial proteomics on human fibroblasts for identification of metabolic imbalance and cellular stress*. Proteome Science, 2009. **7**: p. 20.
68. Sim, K.G., Carpenter, K., Hammond, J., Christodoulou, J., and Wilcken, B., *Quantitative fibroblast acylcarnitine profiles in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: phenotype/metabolite correlations*. Molecular Genetics and Metabolism, 2002. **76**(4): p. 327-334.
69. Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D., Olgemöller, K., Mayatepek, E., and Hoffmann, G.F., *Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications*. Pediatrics, 2003. **111**(6): p. 1399-1406.
70. Levy, H.L., *Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: A New Era*. Clinical Chemistry, 1998. **44**(12): p. 2401-2402.

71. Chace, D.H., Kalas, T.A., and Naylor, E.W., *Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns*. Clinical Chemistry, 2003. **49**(11): p. 1797-1817.
72. *Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - Doenças Rastreadas*. Accessed in: Junho 2011]; Available from: <http://www.diagnosticoprecoce.org/doencasrastreadas.htm>.
73. Ishii, K., Komaki, H., Ohkuma, A., Nishino, I., Nonaka, I., and Sasaki, M., *Central nervous system and muscle involvement in an adolescent patient with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Brain and Development, 2010. **32**(8): p. 669-672.
74. Przyrembel, H., Wendel, U., Becker, K., Bremer, H.J., Bruinvis, L., Ketting, D., and Wadman, S.K., *Glutaric aciduria type II: Report on a previously undescribed metabolic disorder*. Clinica Chimica Acta, 1976. **66**(2): p. 227-239.
75. DiMauro, S., Garone, C., and Naini, A., *Metabolic Myopathies*. Current Rheumatology Reports, 2010. **12**(5): p. 386-393.
76. Law, L.K., Tang, N.L.S., Hui, J., Fung, S.L.M., Ruiter, J., Wanders, R.J.A., Fok, T.F., and Lam, C.W.K., *Novel mutations in ETFDH gene in Chinese patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Clinica Chimica Acta, 2009. **404**(2): p. 95-99.
77. Singla, M., Guzman, G., Griffin, A.J., and Bharati, S., *Cardiomyopathy in multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Pediatric Cardiology, 2008. **29**(2): p. 446-451.
78. Liang, W.-C., Ohkuma, A., Hayashi, Y.K., López, L.C., Hirano, M., Nonaka, I., Noguchi, S., Chen, L.-H., Jong, Y.-J., and Nishino, I., *ETFDH mutations, CoQ10 levels, and respiratory chain activities in patients with riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*. Neuromuscular Disorders, 2009. **19**(3): p. 212-216.
79. Goodman, S.I., *Prenatal diagnosis of glutaric acidemias*. Prenatal Diagnosis, 2001. **21**(13): p. 1167-8.
80. Gregersen, N., Wintzensen, H., Kolvraa, S., Christensen, E., Christensen, M.F., Brandt, N.J., and Rasmussen, K., *C-6-C-10-Dicarboxylic aciduria - Investigations of a patient with riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation defects*. Pediatric Research, 1982. **16**(10): p. 861-868.
81. Gregersen, N., *Riboflavin-responsive defects of beta-oxidation*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 1985. **8**: p. 65-69.
82. Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B.G.H., Hans, V.H., Palmafy, B., Kale, G., Tokatli, A., Quinzii, C., Hirano, M., Naini, A., DiMauro, S., Prokisch, H., Lochmuller, H., and Horvath, R., *The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene*. Brain, 2007. **130**: p. 2037-2044.
83. Wang, Z.Q., Chen, X.J., Murong, S.X., Wang, N., and Wu, Z.Y., *Molecular analysis of 51 unrelated pedigrees with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD) in southern China confirmed the most common ETFDH mutation and high carrier frequency of c.250G > A*. Journal of Molecular Medicine-Jmm, 2011. **89**(6): p. 569-576.
84. Yotsumoto, Y., Hasegawa, Y., Fukuda, S., Kobayashi, H., Endo, M., Fukao, T., and Yamaguchi, S., *Clinical and molecular investigations of Japanese cases of glutaric acidemia type 2*. Molecular Genetics and Metabolism, 2008. **94**(1): p. 61-67.

85. Curcoy, A., Olsen, R.K.J., Ribes, A., Trenchs, V., Vilaseca, M.A., Campistol, J., Osorio, J.H., Andresen, B.S., and Gregersen, N., *Late-onset form of [beta]-electron transfer flavoprotein deficiency*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2003. **78**(4): p. 247-249.
86. Schwab, M.A., Kolker, S., van den Heuvel, L.P., Sauer, S., Wolf, N.I., Rating, D., Hoffmann, G.F., Smeitink, J.A.M., and Okun, J.G., *Optimized Spectrophotometric Assay for the Completely Activated Pyruvate Dehydrogenase Complex in Fibroblasts*. *Clinical Chemistry*, 2005. **51**(1): p. 151-160.
87. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *Journal of Biological Chemistry*, 1951. **193**(1): p. 265-275.
88. Vitorino, R., Ferreira, R., Neuparth, M., Guedes, S., Williams, J., Tomer, K.B., Domingues, P.M., Appell, H.J., Duarte, J.A., and Amado, F.M.L., *Subcellular proteomics of mice gastrocnemius and soleus muscles*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **366**(2): p. 156-169.
89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-&.
90. Detweiler, C.D., Deterding, L.J., Tomer, K.B., Chignell, C.F., Germolec, D., and Mason, R.P., *Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. **33**(3): p. 364-369.
91. Palmfeldt, J., Vang, S., Stenbroen, V., Pavlou, E., Baycheva, M., Buchal, G., Monavari, A.A., Augoustides-Savvopoulou, P., Mandel, H., and Gregersen, N., *Proteomics reveals that redox regulation is disrupted in Patients with Ethylmalonic Encephalopathy*. *Journal of Proteome Research*, 2011. **10**(5): p. 2389-2396.
92. Wolfe, L., He, M., Vockley, J., Payne, N., Rhead, W., Hoppel, C., Spector, E., Gernert, K., and Gibson, K., *Novel ETF dehydrogenase mutations in a patient with mild glutaric aciduria type II and complex II-III deficiency in liver and muscle*. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2010: p. 1-7.
93. Rocha, H., Ferreira, R., Carvalho, J., Vitorino, R., Santa, C., Lopes, L., Gregersen, N., Vilarinho, L., and Amado, F., *Characterization of mitochondrial proteome in a severe case of ETF-QO deficiency*. *Journal of Proteomics*. 2011 May 7. [Epub ahead of print].
94. Henriques, B.J., Rodrigues, J.V., Olsen, R.K., Bross, P., and Gomes, C.M., *Role of Flavinylation in a Mild Variant of Multiple Acyl-CoA Dehydrogenation Deficiency*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(7): p. 4222-4229.
95. Saijo, T. and Tanaka, K., *Isoalloxazine Ring of FAD Is Required for the Formation of the Core in the Hsp60-assisted Folding of Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Subunit into the Assembly Competent Conformation in Mitochondria*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(4): p. 1899-1907.
96. Beard, S.E., Goodman, S.I., Bemelen, K., and Frerman, F.E., *Characterization of a mutation that abolishes quinone reduction by electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase*. *Human Molecular Genetics*, 1995. **4**(2): p. 157-161.
97. Usselman, R.J., Fielding, A.J., Frerman, F.E., Watmough, N.J., Eaton, G.R., and Eaton, S.S., *Impact of mutations on the midpoint potential of the 4Fe-4S (+1,+2) cluster and on catalytic activity in electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETF-QO)*. *Biochemistry*, 2008. **47**(1): p. 92-100.

98. Tatsuta, T. and Langer, T., *Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing*. EMBO Journal, 2008. **27**(2): p. 306-314.
99. Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., and Christensen, J.H., *Protein misfolding and human disease*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2006. **7**: p. 103-124.
100. Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R., and Asano, T., *Copurification of small heat shock protein with alpha B crystallin from human skeletal muscle*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(11): p. 7718-7725.
101. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J., *Small heat shock proteins are molecular chaperones*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(3): p. 1517-1520.
102. Picard, D., *Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002. **59**(10): p. 1640-1648.
103. Chowdhury, I., Mo, Y., Gao, L., Kazi, A., Fisher, A.B., and Feinstein, S.I., *Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(2): p. 146-153.
104. Gregersen, N. and Bross, P., *Protein misfolding and cellular stress: an overview*. Methods in Molecular Biology, 2010. **648**: p. 3-23.
105. Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C., *Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant*. Antioxidants & Redox Signaling, 2009. **11**(11): p. 2685-2700.
106. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine*. Annual Review of Genetics, 2005. **39**: p. 359-407.
107. Song, Y., Selak, M.A., Watson, C.T., Coutts, C., Scherer, P.C., Panzer, J.A., Gibbs, S., Scott, M.O., Willer, G., Gregg, R.G., Ali, D.W., Bennett, M.J., and Balice-Gordon, R.J., *Mechanisms Underlying Metabolic and Neural Defects in Zebrafish and Human Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD)*. Plos One, 2009. **4**(12): p. e8329.
108. Huang, J., Hao, L., Xiong, N., Cao, X., Liang, Z., Sun, S., and Wang, T., *Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: Relevance to protein misfolding and aggregation*. Brain Research, 2009. **1279**: p. 1-8.
109. Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W., and Sawa, A., *The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments*. Cellular Signalling, 2011. **23**(2): p. 317-323.
110. Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N., Zamzami, N., Jan, G., Kroemer, G., and Brenner, C., *GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2606-2620.
111. Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L., *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins*. Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
112. Ekert, P.G., Silke, J., Hawkins, C.J., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L., *DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9*. Journal of Cell Biology, 2001. **152**(3): p. 483-490.

113. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y., *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 483-487.
114. Artal-Sanz, M. and Tavernarakis, N., *Prohibitin and mitochondrial biology*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2009. **20**(8): p. 394-401.
115. Artal-Sanz, M. and Tavernarakis, N., *Opposing function of mitochondrial prohibitin in aging*. Aging-Us, 2010. **2**(12): p. 1004-1011.

IX - Anexos

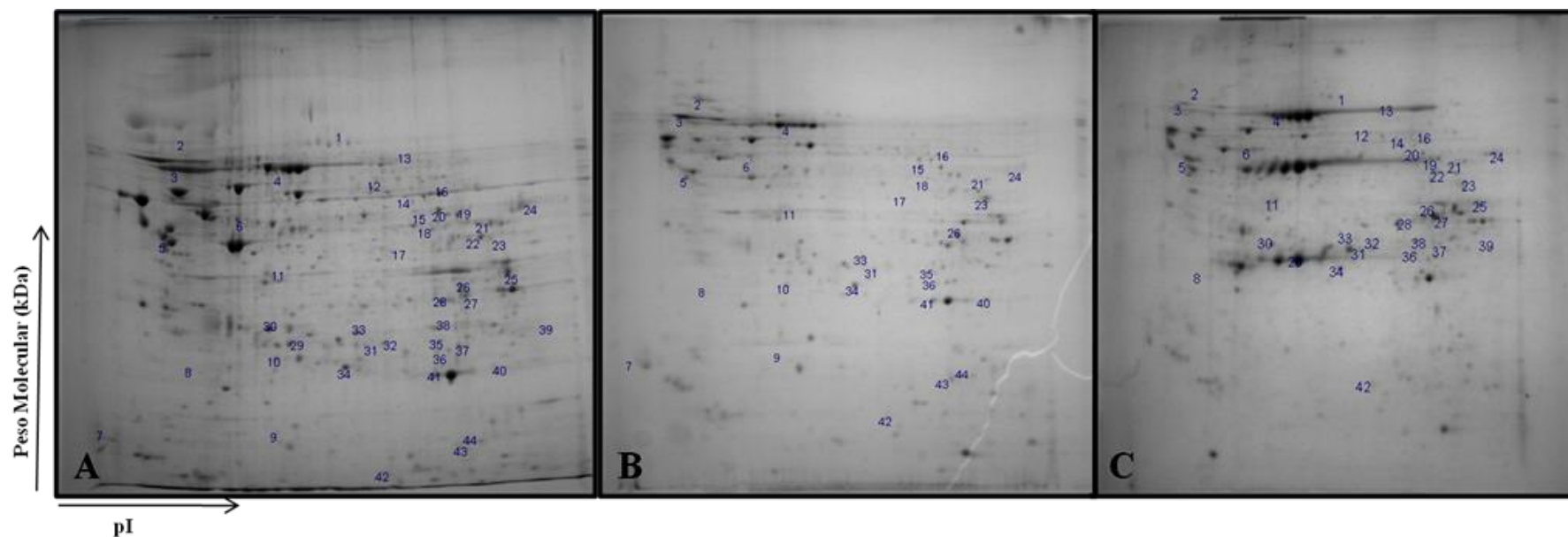
Anexo A

Figura A-1 - Imagens representativas dos géis obtidos na separação proteica das fracções mitocondriais dos indivíduos Controlo (A), do Doente 1 (B) e do Doente 2 (C) realizada por electroforese bidimensional. A numeração nas imagens indica os *spots* cujas proteínas se encontram diferentemente expressas em cada um dos casos em estudo e tem correspondência na Tabela 3. (Figura ampliada)

Anexo B

Tabela B-1 - Proteínas totais identificadas por espectrometria de massa a partir a partir dos géis 2DE dos indivíduos controlo. Os números dos *spot* correspondem ao valores que lhes foram atribuídos por altura da sua excisão dos géis.

<i>Spot</i>	Proteína	Número de Acesso	Peso Molecular	pI	Classe Funcional
7	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	GANAB_HUMAN	106806.6406	5.74	Metabolismo
9	<i>Mitochondrial inner membrane protein</i>	IMMT_HUMAN	83626.35156	6.08	<i>Protein Binding/Folding</i>
10	<i>Mitochondrial inner membrane protein</i>	IMMT_HUMAN	83626.35156	6.08	<i>Protein Binding/Folding</i>
11	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
14	<i>Endoplasmic</i>	ENPL_HUMAN	92411.34375	4.76	<i>Protein Binding/Folding</i>
16	<i>Putative endoplasmic-like protein</i>	ENPLL_HUMAN	45829.87891	5.14	<i>Protein Binding/Folding</i>
18	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	HS90A_HUMAN	84606.67969	4.94	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	HS90B_HUMAN	83212.10156	4.97	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2</i>	HS902_HUMAN	39340.42969	4.57	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4</i>	HS904_HUMAN	47682.12109	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS</i>	H90B3_HUMAN	68281.96094	4.71	<i>Protein Binding/Folding</i>
20	<i>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1</i>	LIMS1_HUMAN	37225.83984	8.43	Adesão
22	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	ACON_HUMAN	85371.92188	7.36	Metabolismo
	<i>F-box only protein 28</i>	FBX28_HUMAN	41123.39844	9.59	Proteólise
23	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
24	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>
25	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	NDUS1_HUMAN	79416.53906	5.89	Fosforilação Oxidativa
26	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	NDUS1_HUMAN	79416.53906	5.89	Fosforilação Oxidativa
27	<i>Retinoblastoma-binding protein 6</i>	RBBP6_HUMAN	201441.7031	9.65	<i>Protein Binding/Folding</i>
28	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
	<i>Ezrin</i>	EZRI_HUMAN	69369.74219	5.94	Adesão

	<i>FK506-binding protein 10</i>	FKB10_HUMAN	64204.17969	5.36	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Moesin</i>	MOES_HUMAN	67777.78906	6.08	Adesão
	<i>Radixin</i>	RADI_HUMAN	68521.39063	6.03	Estrutura
29	<i>Ezrin</i>	EZRI_HUMAN	69369.74219	5.94	Adesão
	<i>FK506-binding protein 10</i>	FKB10_HUMAN	64204.17969	5.36	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Moesin</i>	MOES_HUMAN	67777.78906	6.08	Adesão
30	<i>FK506-binding protein 10</i>	FKB10_HUMAN	64204.17969	5.36	<i>Protein Binding/Folding</i>
31	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	HS90A_HUMAN	84606.67969	4.94	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	PDIA4_HUMAN	72886.96875	4.96	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2</i>	HS902_HUMAN	39340.42969	4.57	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Putative heat shock protein HSP 90-beta-3</i>	H90B3_HUMAN	68281.96094	4.71	<i>Protein Binding/Folding</i>
34	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
36	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
37	<i>Centlein</i>	CNTLN_HUMAN	161515.8906	8.28	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>FK506-binding protein 9</i>	FKBP9_HUMAN	63043.51172	4.91	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
38	<i>FK506-binding protein 9</i>	FKBP9_HUMAN	63043.51172	4.91	<i>Protein Binding/Folding</i>
38	<i>Protein Shroom3</i>	SHRM3_HUMAN	216528.2344	7.75	Estrutura
38	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
40	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSP7C_HUMAN	70854.21875	5.37	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
41	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSP7C_HUMAN	70854.21875	5.37	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
44	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>V-type proton ATPase catalytic subunit A</i>	VATA_HUMAN	68260.49219	5.35	Transporte
45	<i>Annexin A6</i>	ANXA6_HUMAN	75825.57031	5.42	Transdução do Sinal
	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>
46	<i>Annexin A6</i>	ANXA6_HUMAN	75825.57031	5.42	Transdução do Sinal

	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>
47	<i>Annexin A6</i>	ANXA6_HUMAN	75825.57031	5.42	Transdução do Sinal
	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	GRP75_HUMAN	73634.77344	5.87	<i>Protein Binding/Folding</i>
49	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
50	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
51	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
52	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
53	<i>Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2</i>	ANKL2_HUMAN	104056.6172	6.56	Estrutura
	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1_HUMAN	65999	8.15	Estrutura
55	<i>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1</i>	LIMS1_HUMAN	37225.83984	8.43	Adesão
56	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	MAP1B_HUMAN	270454	4.73	Estrutura
59	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	TBA1C_HUMAN	49863.46094	4.96	Estrutura
	<i>Vimentin</i>	VIME_HUMAN	53619.07813	5.06	Estrutura
60	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	CH60_HUMAN	61016.37891	5.7	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1_HUMAN	65999	8.15	Estrutura
	<i>Keratin, type II cytoskeletal 6B</i>	K2C6B_HUMAN	60030.28906	8.09	Estrutura
61	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	CH60_HUMAN	61016.37891	5.7	<i>Protein Binding/Folding</i>
62	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	CH60_HUMAN	61016.37891	5.7	<i>Protein Binding/Folding</i>
63	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	CH60_HUMAN	61016.37891	5.7	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	TCPE_HUMAN	59632.80859	5.45	<i>Protein Binding/Folding</i>
64	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	TCPA_HUMAN	60305.57813	5.8	<i>Protein Binding/Folding</i>
68	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Tubulin beta chain</i>	TBB5_HUMAN	49638.96875	4.78	Estrutura
	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	TBB2B_HUMAN	49920.94141	4.78	Estrutura
	<i>Tubulin beta-2C chain</i>	TBB2C_HUMAN	49799	4.79	Estrutura
	<i>Tubulin beta-4 chain</i>	TBB4_HUMAN	49553.89844	4.78	Estrutura
70	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
71	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal

	<i>Nebulin-related-anchoring protein</i>	NRAP_HUMAN	196950.2969	9.24	Estrutura
	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
72	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
74	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59713.58984	9.16	Fosforilação Oxidativa
	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	DHE3_HUMAN	61359.19141	7.66	Metabolismo
	<i>Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	DHE4_HUMAN	61395.42969	8.63	Metabolismo
	<i>Plasma kallikrein</i>	KLKB1_HUMAN	71322.84375	8.6	Proteólise
	<i>Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial</i>	GLYM_HUMAN	55957.73047	8.76	Metabolismo
75	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	TBA1A_HUMAN	50103.60938	4.94	Estrutura
	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	TBA1B_HUMAN	50119.60156	4.94	Estrutura
	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	TBA1C_HUMAN	49863.46094	4.96	Estrutura
	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	TBA4A_HUMAN	49892.37109	4.95	Estrutura
	<i>Tubulin alpha-8 chain</i>	TBA8_HUMAN	50061.55078	4.94	Estrutura
76	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB_HUMAN	56524.60156	5.26	Fosforilação Oxidativa
	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	TBA1B_HUMAN	50119.60156	4.94	Estrutura
	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	TBA1C_HUMAN	49863.46094	4.96	Estrutura
82	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal
	<i>Nebulin-related-anchoring protein</i>	NRAP_HUMAN	196950.2969	9.24	Estrutura
	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
83	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal
	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
84	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal
	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3_HUMAN	56746.75	5.98	Transdução do Sinal / Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
85	<i>Calreticulin</i>	CALR_HUMAN	48111.82031	4.29	Transdução do Sinal
87	<i>Calumenin</i>	CALU_HUMAN	37083.53906	4.47	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Reticulocalbin-2</i>	RCN2_HUMAN	36853.64063	4.26	Transdução do Sinal

89	<i>Calumenin</i>	CALU_HUMAN	37083.53906	4.47	<i>Protein Binding/Folding</i>
91	<i>Desmin</i>	DESM_HUMAN	53503.14844	5.21	Estrutura
	<i>Vimentin</i>	VIME_HUMAN	53619.07813	5.06	Estrutura
92	<i>Reticulocalbin-1</i>	RCN1_HUMAN	38866.16016	4.86	Transdução do Sinal
	<i>Reticulocalbin-3</i>	RCN3_HUMAN	37470	4.74	Transdução do Sinal
93	<i>Reticulocalbin-1</i>	RCN1_HUMAN	38866.16016	4.86	Transdução do Sinal
	<i>Vimentin</i>	VIME_HUMAN	53619.07813	5.06	Estrutura
94	<i>Vimentin</i>	VIME_HUMAN	53619.07813	5.06	Estrutura
95	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	GRP78_HUMAN	72288.42969	5.07	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	PDIA1_HUMAN	57080.67188	4.76	Redox
	<i>Vimentin</i>	VIME_HUMAN	53619.07813	5.06	Estrutura
97	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB_HUMAN	56524.60156	5.26	Fosforilação Oxidativa
98	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB_HUMAN	56524.60156	5.26	Fosforilação Oxidativa
99	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB_HUMAN	56524.60156	5.26	Fosforilação Oxidativa
	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	PDIA6_HUMAN	48091.26172	4.95	Redox
101	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	PDIA6_HUMAN	48091.26172	4.95	Redox
	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	PDIA6_HUMAN	48091.26172	4.95	Redox
102	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>	TXND5_HUMAN	47598.66016	5.63	Redox
103	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	ACTC_HUMAN	41991.87891	5.23	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member E</i>	POTEE_HUMAN	121285.6563	5.83	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member F</i>	POTEF_HUMAN	121366.6875	5.83	Estrutura
	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>	TXND5_HUMAN	47598.66016	5.63	Redox
104	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	IF4A1_HUMAN	46124.55078	5.32	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-II</i>	IF4A2_HUMAN	46372.78125	5.33	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	TPP1_HUMAN	61209.62891	6.01	Proteólise / <i>Protein Binding/Folding</i>
105	<i>Thioredoxin domain-containing protein 5</i>	TXND5_HUMAN	47598.66016	5.63	Redox
106	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	QCR1_HUMAN	52612.42969	5.94	Fosforilação Oxidativa
107	<i>Actin-related protein 11</i>	ARP11_HUMAN	23697.13086	5.36	Estrutura
	<i>Actin-related protein 3</i>	ARP3_HUMAN	47340.98047	5.61	Estrutura
	<i>Actin-related protein 3B</i>	ARP3B_HUMAN	47577.16016	5.61	Estrutura
109	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	ACTC_HUMAN	41991.87891	5.23	Estrutura
	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	ACTS_HUMAN	42023.85156	5.23	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	ACTB_HUMAN	41709.73047	5.29	Estrutura

	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	41765.78906	5.31	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member F</i>	POTEF_HUMAN	121366.6875	5.83	Estrutura
113	<i>40S ribosomal protein SA</i>	RSSA_HUMAN	32833.42969	4.79	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
114	<i>40S ribosomal protein SA</i>	RSSA_HUMAN	32833.42969	4.79	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
115	<i>40S ribosomal protein SA</i>	RSSA_HUMAN	32833.42969	4.79	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
117	<i>GTPase IMAP family member 8</i>	GIMA8_HUMAN	74843.40625	8.62	Transdução do Sinal
	<i>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1</i>	LIMS1_HUMAN	37225.83984	8.43	Adesão
118	<i>Protein ECT2</i>	ECT2_HUMAN	99987.27344	7.28	Apoptose
	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1_HUMAN	32688.67969	4.69	Estrutura
	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3_HUMAN	32798.73828	4.68	Estrutura
119	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3_HUMAN	32798.73828	4.68	Estrutura
	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	TPM4_HUMAN	28504.49023	4.67	Estrutura
125	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB_HUMAN	56524.60156	5.26	Fosforilação Oxidativa
127	<i>Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein</i>	TPM3L_HUMAN	26252.91016	4.47	Estrutura
	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1_HUMAN	32688.67969	4.69	Estrutura
	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3_HUMAN	32798.73828	4.68	Estrutura
	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	TPM4_HUMAN	28504.49023	4.67	Estrutura
	<i>Tropomyosin beta chain</i>	TPM2_HUMAN	32830.57031	4.66	Estrutura
128	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	1433E_HUMAN	29155.41992	4.63	Transdução do Sinal
129	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	1433E_HUMAN	29155.41992	4.63	Transdução do Sinal
	<i>Cytochrome b5</i>	CYB5_HUMAN	15320.50977	4.88	Fosforilação Oxidativa
130	<i>Reticulocalbin-1</i>	RCN1_HUMAN	38866.16016	4.86	Transdução do Sinal
131	<i>Annexin A5</i>	ANXA5_HUMAN	35914.39844	4.94	Transdução do Sinal
132	<i>Annexin A5</i>	ANXA5_HUMAN	35914.39844	4.94	Transdução do Sinal
133	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	1433B_HUMAN	28064.83008	4.76	Transdução do Sinal
	<i>14-3-3 protein eta</i>	1433F_HUMAN	28201.01953	4.76	Transdução do Sinal
	<i>14-3-3 protein gamma</i>	1433G_HUMAN	28284.91016	4.8	Transdução do Sinal
	<i>14-3-3 protein theta</i>	1433T_HUMAN	27746.76953	4.68	Transdução do Sinal
	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	1433Z_HUMAN	27727.73047	4.73	Transdução do Sinal

136	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	ACTC_HUMAN	41991.87891	5.23	Estrutura
	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	ACTS_HUMAN	42023.85156	5.23	Estrutura
	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	ACTA_HUMAN	41981.80078	5.23	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	41765.78906	5.31	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member F</i>	POTEF_HUMAN	121366.6875	5.83	Estrutura
140	<i>Cytochrome b5</i>	CYB5_HUMAN	15320.50977	4.88	Fosforilação Oxidativa
141	<i>FUN14 domain-containing protein 2</i>	FUND2_HUMAN	20662.71094	9.74	Desconhecida
142	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	IF5A1_HUMAN	16821.40039	5.08	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
144	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	RLA2_HUMAN	11657.84961	4.42	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Myosin regulatory light chain 12B</i>	ML12B_HUMAN	19766.51953	4.71	Estrutura
145	<i>ATP synthase subunit delta, mitochondrial</i>	ATPD_HUMAN	17479.18945	5.38	Fosforilação Oxidativa
	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	MYL6_HUMAN	16919.13086	4.56	Estrutura
	<i>Peroxidasin homolog</i>	PXDN_HUMAN	165169.875	6.79	Redox
	<i>Protein PAPPAS</i>	PAPAS_HUMAN	12188.38965	9.78	Estrutura
146	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	MYL6_HUMAN	16919.13086	4.56	Estrutura
147	<i>Glutathione S-transferase P</i>	GSTP1_HUMAN	23341.01953	5.43	Redox
148	<i>Girdin</i>	GRDN_HUMAN	215909.1094	5.9	Transdução do Sinal / Transporte
150	<i>Galectin-1</i>	LEG1_HUMAN	14706.2002	5.34	Apoptose / Transdução do Sinal
152	<i>Diablo homolog, mitochondrial</i>	DBLOH_HUMAN	27113.7207	5.68	Apoptose
153	<i>Calcium-binding protein p22</i>	CHP1_HUMAN	22442.33984	4.98	Transdução do Sinal
	<i>Translationally-controlled tumor protein</i>	TCTP_HUMAN	19582.58008	4.84	Apoptose / Transporte
155	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	GDIR1_HUMAN	23192.69922	5.02	Transdução do Sinal
156	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex,</i>	ODO2_HUMAN	48698.44141	9.11	Metabolismo
157	<i>39S ribosomal protein L12, mitochondrial</i>	RM12_HUMAN	21334.65039	9.04	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_HUMAN	22768.49023	5.98	<i>Protein Binding/Folding</i>
161	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	PPIB_HUMAN	23727.5293	9.42	Metabolismo
162	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	PPIB_HUMAN	23727.5293	9.42	Metabolismo
165	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5</i>	NDUA5_HUMAN	13450.16992	5.75	Fosforilação Oxidativa
167	<i>Transgelin-2</i>	TAGL2_HUMAN	22377.16992	8.41	Transdução do Sinal
170	<i>Ferritin light chain</i>	FRIL_HUMAN	20007.09961	5.51	Transporte / Redox

172	<i>Glutathione S-transferase P</i>	GSTP1_HUMAN	23341.01953	5.43	Redox
174	<i>2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial</i>	KBL_HUMAN	45256.19922	8.3	Metabolismo
175	<i>Zinc finger protein 462</i>	ZN462_HUMAN	284505.875	7.53	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
176	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial</i>	NDUV2_HUMAN	27374.00977	8.22	Fosforilação Oxidativa
178	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	HEXB_HUMAN	63071.17969	6.29	Metabolismo
	<i>Cathepsin B</i>	CATB_HUMAN	37796.82813	5.88	Proteólise
179	<i>Cathepsin D</i>	CATD_HUMAN	44523.62109	6.1	Proteólise
181	<i>Retinoic acid receptor responder protein 3</i>	TIG3_HUMAN	18167.26953	8.78	Transdução do Sinal
183	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Krueppel-like factor 2</i>	KLF2_HUMAN	37395.78906	9.06	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
185	<i>F-box only protein 28</i>	FBX28_HUMAN	41123.39844	9.59	Proteólise
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	36030.39844	8.57	Metabolismo
186	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	ACTS_HUMAN	42023.85156	5.23	Estrutura
	<i>Actin, aortic smooth muscle</i>	ACTA_HUMAN	41981.80078	5.23	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	ACTB_HUMAN	41709.73047	5.29	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	41765.78906	5.31	Estrutura
	<i>Actin, gamma-enteric smooth muscle</i>	ACTH_HUMAN	41849.78906	5.31	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member F</i>	POTEF_HUMAN	121366.6875	5.83	Estrutura
188	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>	CAZA1_HUMAN	32902.32813	5.45	Estrutura
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	36030.39844	8.57	Metabolismo
	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial</i>	ODPB_HUMAN	39208.03125	6.2	Metabolismo
189	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	RLA0_HUMAN	34251.80078	5.71	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>60S acidic ribosomal protein P0-like</i>	RLA0L_HUMAN	34342.71875	5.41	<i>Protein Binding/Folding</i>
190	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	ACTS_HUMAN	42023.85156	5.23	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	ACTB_HUMAN	41709.73047	5.29	Estrutura
	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	41765.78906	5.31	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member E</i>	POTEE_HUMAN	121285.6563	5.83	Estrutura
193	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	ACTB_HUMAN	41709.73047	5.29	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member E</i>	POTEE_HUMAN	121285.6563	5.83	Estrutura
194	<i>Serum albumin</i>	ALBU_HUMAN	69321.49219	5.92	Transporte / Redox
196	<i>Adipocyte plasma membrane-associated protein</i>	APMAP_HUMAN	46450.85156	5.82	Metabolismo

197	<i>Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1</i>	SCMC1_HUMAN	53320.33984	6	Transdução do Sinal
198	<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>	MPPB_HUMAN	54331.48828	6.38	Proteólise
202	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1_HUMAN	65999	8.15	Estrutura
	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 4</i>	SMC4_HUMAN	147090.5156	6.37	Estrutura
204	<i>Septin-11</i>	SEP11_HUMAN	49367.19141	6.36	Estrutura
205	<i>Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial</i>	AL1B1_HUMAN	57202.19922	6.36	Metabolismo
206	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 4</i>	SMC4_HUMAN	147090.5156	6.37	Estrutura
209	<i>Cell division cycle protein 20 homolog</i>	CDC20_HUMAN	54688.62891	9.33	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
210	<i>Glutaminase kidney isoform, mitochondrial</i>	GLSK_HUMAN	73413.89844	7.85	Metabolismo
211	<i>Dual specificity protein kinase TTK</i>	TTK_HUMAN	97011.09375	8.41	Estrutura
212	<i>Glutaminase kidney isoform, mitochondrial</i>	GLSK_HUMAN	73413.89844	7.85	Metabolismo
213	<i>Glutaminase kidney isoform, mitochondrial</i>	GLSK_HUMAN	73413.89844	7.85	Metabolismo
215	<i>Putative uncharacterized protein FLJ45035</i>	YD023_HUMAN	15487.54004	7.41	Desconhecida
217	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	ACADM_HUMAN	46558.57813	8.61	Metabolismo
218	<i>F-box only protein 28</i>	FBX28_HUMAN	41123.39844	9.59	Proteólise
	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial</i>	DHSA_HUMAN	72645.28906	7.06	Metabolismo
221	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial</i>	GPDM_HUMAN	80801.60938	7.57	Metabolismo
222	<i>Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial</i>	SCOT1_HUMAN	56121.92969	7.14	Metabolismo
223	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59713.58984	9.16	Fosforilação Oxidativa
224	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase</i>	AL7A1_HUMAN	55331.46094	6.44	Metabolismo
	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59713.58984	9.16	Fosforilação Oxidativa
226	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	G6PD_HUMAN	59218.98828	6.39	Metabolismo
227	<i>Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial</i>	MCCB_HUMAN	61294.41016	7.57	Metabolismo
228	<i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial</i>	AL4A1_HUMAN	61680.58984	8.25	Metabolismo / Redox
	<i>Tektin-3</i>	TEKT3_HUMAN	56600.53125	6.93	Estrutura
230	<i>Septin-11</i>	SEP11_HUMAN	49367.19141	6.36	Estrutura
231	<i>Alpha-enolase</i>	ENOA_HUMAN	47139.32031	7.01	Metabolismo
	<i>Beta-enolase</i>	ENOB_HUMAN	46902.28125	7.59	Metabolismo
	<i>Gamma-enolase</i>	ENOG_HUMAN	47239	4.91	Metabolismo
232	<i>LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1</i>	LIMS1_HUMAN	37225.83984	8.43	Adesão
	<i>Septin-11</i>	SEP11_HUMAN	49367.19141	6.36	Estrutura
233	<i>Alpha-aminoadipic semialdehyde</i>	AL7A1_HUMAN	55331.46094	6.44	Metabolismo

	<i>dehydrogenase</i>				
	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59713.58984	9.16	Fosforilação Oxidativa
234	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	DHE3_HUMAN	61359.19141	7.66	Metabolismo
	<i>Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	DHE4_HUMAN	61395.42969	8.63	Metabolismo
235	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	ATPA_HUMAN	59713.58984	9.16	Fosforilação Oxidativa
237	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial</i>	IDH3A_HUMAN	39566.07031	6.47	Metabolismo
238	<i>Elongation factor 2</i>	EF2_HUMAN	95276.95313	6.41	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
239	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial</i>	IDH3A_HUMAN	39566.07031	6.47	Metabolismo
241	<i>28S ribosomal protein S22, mitochondrial</i>	RT22_HUMAN	41254.39063	7.7	<i>Protein Binding/Folding</i>
243	<i>Liprin-alpha-3</i>	LIPA3_HUMAN	133413.8438	5.53	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Septin-2</i>	SEPT2_HUMAN	41461.25	6.15	Estrutura
244	<i>Septin-2</i>	SEPT2_HUMAN	41461.25	6.15	Estrutura
245	<i>Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	ACADS_HUMAN	44268.76172	8.13	Metabolismo
246	<i>Alpha-centractin</i>	ACTZ_HUMAN	42586.89844	6.19	Transporte
248	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	EFTU_HUMAN	49510.17969	7.26	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
249	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	IDHC_HUMAN	46629.51172	6.53	Metabolismo
250	<i>Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	ACADM_HUMAN	46558.57813	8.61	Metabolismo
251	<i>Acyl-coenzyme A thioesterase 1</i>	ACOT1_HUMAN	46248.05078	6.9	Metabolismo
	<i>Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial</i>	ACOT2_HUMAN	53203.76953	8.82	Metabolismo
	<i>Paraneoplastic antigen-like protein 6A</i>	PNM6A_HUMAN	43847.37109	5.24	Desconhecida
	<i>Paraneoplastic antigen-like protein 6B</i>	PNM6B_HUMAN	43978.48047	5.31	Desconhecida
252	<i>Fumarate hydratase, mitochondrial</i>	FUMH_HUMAN	54602.17188	8.85	Metabolismo
	<i>Matrix-remodeling-associated protein 5</i>	MXRA5_HUMAN	312085.0313	8.57	Adesão
253	<i>Fumarate hydratase, mitochondrial</i>	FUMH_HUMAN	54602.17188	8.85	Metabolismo
254	<i>Alpha-enolase</i>	ENOA_HUMAN	47139.32031	7.01	Metabolismo
	<i>Beta-enolase</i>	ENOB_HUMAN	46902.28125	7.59	Metabolismo
	<i>Gamma-enolase</i>	ENOG_HUMAN	47239	4.91	Metabolismo
255	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog</i>	TOM40_HUMAN	37869.14063	6.79	Transporte
258	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	THIL_HUMAN	45170.64063	8.98	Metabolismo
259	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial</i>	QCR2_HUMAN	48412.87891	8.74	Fosforilação Oxidativa
260	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	THIM_HUMAN	41897.64063	8.32	Metabolismo
	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	PGK1_HUMAN	44586.12891	8.3	Metabolismo

	<i>Phosphoglycerate kinase 2</i>	PGK2_HUMAN	44767.32813	8.74	Metabolismo
261	<i>Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2</i>	ANKL2_HUMAN	104056.6172	6.56	Estrutura
	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	EF1A1_HUMAN	50109.10938	9.1	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>	EF1A3_HUMAN	50153.14844	9.15	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
262	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	THIL_HUMAN	45170.64063	8.98	Metabolismo
263	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	ALDOA_HUMAN	39395.30078	8.3	Metabolismo
264	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	ALDOA_HUMAN	39395.30078	8.3	Metabolismo
265	<i>Serpin H1</i>	SERPH_HUMAN	46411.17969	8.75	<i>Protein Binding/Folding</i>
266	<i>Elongation factor 1-alpha 1</i>	EF1A1_HUMAN	50109.10938	9.1	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>	EF1A3_HUMAN	50153.14844	9.15	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Serpin H1</i>	SERPH_HUMAN	46411.17969	8.75	<i>Protein Binding/Folding</i>
269	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
270	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
271	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
271	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
272	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>	K1C9_HUMAN	62026.80859	5.14	Estrutura
	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1_HUMAN	65999	8.15	Estrutura
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
273	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>FERM domain-containing protein 5</i>	FRMD5_HUMAN	65023.48828	8.62	Estrutura
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
274	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
275	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	G3P_HUMAN	36030.39844	8.57	Metabolismo
276	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal

	<i>Keratin, type I cuticular Ha1</i>	K1H1_HUMAN	47207.05078	4.84	Estrutura
	<i>Keratin, type II cuticular Hb1</i>	KRT81_HUMAN	54935.78125	5.48	Estrutura
280	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	MDHM_HUMAN	35480.73047	8.92	Metabolismo
	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15</i>	M3K15_HUMAN	147344.2656	5.42	Transdução do Sinal
281	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	MDHM_HUMAN	35480.73047	8.92	Metabolismo
282	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
283	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 2</i>	VDAC2_HUMAN	31546.55078	7.49	Transporte
284	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1</i>	GBLP_HUMAN	35054.55859	7.6	Transdução do Sinal
286	<i>Syntenin-1</i>	SDCB1_HUMAN	32423.91992	7.05	Adesão
287	<i>Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial</i>	ETFA_HUMAN	35057.57813	8.62	Fosforilação Oxidativa
289	<i>3-mercaptopyruvate sulfurtransferase</i>	THTM_HUMAN	33157.64063	6.13	Metabolismo
290	<i>Serine protease HTRA2, mitochondrial</i>	HTRA2_HUMAN	48810.92969	10.0	Apoptose / Proteólise
294	<i>Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i>	ECH1_HUMAN	35793.37891	8.16	Metabolismo
295	<i>Annexin A4</i>	ANXA4_HUMAN	35860.12109	5.84	Transdução do Sinal
299	<i>Chloride intracellular channel protein 4</i>	CLIC4_HUMAN	28753.74023	5.45	Transporte
300	<i>Beta-hexosaminidase subunit beta</i>	HEXB_HUMAN	63071.17969	6.29	Metabolismo
	<i>Nicotinamide N-methyltransferase</i>	NNMT_HUMAN	29555.06055	5.56	Metabolismo
301	<i>Peroxiredoxin-4</i>	PRDX4_HUMAN	30520.81055	5.86	Redox
302	<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_HUMAN	22768.49023	5.98	Protein Binding/Folding
	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial</i>	NDUS3_HUMAN	30222.71094	6.99	Fosforilação Oxidativa
303	<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_HUMAN	22768.49023	5.98	Protein Binding/Folding
	<i>Peroxiredoxin-4</i>	PRDX4_HUMAN	30520.81055	5.86	Redox
304	<i>Endoplasmic reticulum protein ERp29</i>	ERP29_HUMAN	28975.15039	6.77	Transporte
305	<i>Cathepsin D</i>	CATD_HUMAN	44523.62109	6.1	Proteólise
306	<i>Prohibitin</i>	PHB_HUMAN	29785.90039	5.57	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
308	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>	ECHM_HUMAN	31367.13086	8.34	Metabolismo
	<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1_HUMAN	22768.49023	5.98	Protein Binding/Folding
310	<i>Protein ETHE1, mitochondrial</i>	ETHE1_HUMAN	27855.10938	6.35	Metabolismo
311	<i>Peroxiredoxin-6</i>	PRDX6_HUMAN	25019.18945	6	Redox
312	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	PGAM1_HUMAN	28785.83008	6.67	Metabolismo
313	<i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial</i>	D3D2_HUMAN	32795.23828	8.8	Metabolismo

	<i>Endoplasmic reticulum protein ERp29</i>	ERP29_HUMAN	28975.15039	6.77	Transporte
314	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	UCRI_HUMAN	29649.35938	8.55	Fosforilação Oxidativa
	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	VDAC1_HUMAN	30753.57031	8.62	Transporte
317	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	PRDX3_HUMAN	27675.16992	7.67	Redox
318	<i>Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial</i>	PRDX3_HUMAN	27675.16992	7.67	Redox
320	<i>EH domain-binding protein 1</i>	EHBP1_HUMAN	139931.2656	5.24	Fosforilação Oxidativa
	<i>Putative uncharacterized protein FLJ45035</i>	YD023_HUMAN	15487.54004	7.41	Desconhecida
321	<i>Triosephosphate isomerase</i>	TPIS_HUMAN	26652.74023	6.45	Metabolismo
322	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2</i>	HCD2_HUMAN	26906.10938	7.66	Metabolismo
323	<i>CTTNBP2 N-terminal-like protein</i>	CT2NL_HUMAN	70114.78906	8.22	Estrutura
	<i>Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1</i>	FAHD1_HUMAN	24826.73047	6.96	Metabolismo
324	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	PGAM1_HUMAN	28785.83008	6.67	Metabolismo
	<i>Synaptotagmin-like protein 3</i>	SYTL3_HUMAN	68516.32031	9.41	Transdução do Sinal
325	<i>Annexin A2</i>	ANXA2_HUMAN	38579.80859	7.57	Transdução do Sinal
	<i>Putative annexin A2-like protein</i>	AXA2L_HUMAN	38634.82813	6.49	Transdução do Sinal
327	<i>Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial</i>	KAD4_HUMAN	25252.21094	8.47	Metabolismo
328	<i>Electron transfer flavoprotein subunit beta</i>	ETFB_HUMAN	27826.15039	8.24	Fosforilação Oxidativa
329	<i>39S ribosomal protein L17, mitochondrial</i>	RM17_HUMAN	20037.56055	10.1	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Galectin-3</i>	LEG3_HUMAN	26136.05078	8.57	Apoptose / Transdução do Sinal
331	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	SODM_HUMAN	24706.55078	8.35	Redox
334	<i>2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial</i>	DECR_HUMAN	36044.80078	9.35	Metabolismo
	<i>Death-associated protein kinase 2</i>	DAPK2_HUMAN	42871.32813	6.45	Apoptose
	<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>	VDAC1_HUMAN	30753.57031	8.62	Transporte
335	<i>GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial</i>	KAD3_HUMAN	25549.55078	9.15	Transdução do Sinal
336	<i>GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial</i>	KAD3_HUMAN	25549.55078	9.15	Transdução do Sinal
337	<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3</i>	ATF3_HUMAN	20562.68945	8.8	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
	<i>Glutathione S-transferase kappa 1</i>	GSTK1_HUMAN	25480.30078	8.5	Redox
338	<i>Peroxiredoxin-1</i>	PRDX1_HUMAN	22096.2793	8.27	Redox

339	<i>Liprin-alpha-3</i>	LIPA3_HUMAN	133413.8438	5.53	<i>Protein Binding/Folding</i>
	<i>Transgelin-2</i>	TAGL2_HUMAN	22377.16992	8.41	Transdução do Sinal
340	<i>Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial</i>	ISOC2_HUMAN	22322.83984	7.67	Metabolismo
	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	PEBP1_HUMAN	21043.66992	7.01	Transdução do Sinal
341	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	SODM_HUMAN	24706.55078	8.35	Redox
345	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	PSB2_HUMAN	22821.67969	6.51	Proteólise
348	<i>DNA polymerase zeta catalytic subunit</i>	DPOLZ_HUMAN	352554.25	8.72	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
349	<i>Mitogen-activated protein kinase scaffold protein 1</i>	MPKS1_HUMAN	13614.25977	6.73	Transdução do Sinal
350	<i>Histidine triad nucleotide-binding protein 2</i>	HINT2_HUMAN	17151.24023	9.2	Apoptose
351	<i>40S ribosomal protein S12</i>	RS12_HUMAN	14505.48047	6.81	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
352	<i>UPF0556 protein C19orf10</i>	CS010_HUMAN	18783.31055	6.2	Protein Binding/Folding
355	<i>Cystatin-B</i>	CYTB_HUMAN	11132.58984	6.96	Proteólise
356	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial</i>	NDUS6_HUMAN	13702.82031	8.59	Fosforilação Oxidativa
	<i>Vesicle-trafficking protein SEC22b</i>	SC22B_HUMAN	24724.75	8.67	Transporte
357	<i>Profilin-1</i>	PROF1_HUMAN	15044.55957	8.44	Estrutura
358	<i>Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial</i>	SSBP_HUMAN	17249.0293	9.59	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
359	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 7</i>	QCR7_HUMAN	13521.98047	8.73	Fosforilação Oxidativa
360	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	NLTP_HUMAN	58955.60938	6.44	Transporte
361	<i>Centromere protein U</i>	CENPU_HUMAN	47492.53906	9.18	Biossíntese de DNA / RNA / Proteína
362	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	PRDX5_HUMAN	22012.49023	8.85	Redox
363	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA_HUMAN	18000.88086	7.68	Metabolismo
364	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA_HUMAN	18000.88086	7.68	Metabolismo
365	<i>Cofilin-1</i>	COF1_HUMAN	18490.66016	8.22	Transdução do Sinal
	<i>Cofilin-2</i>	COF2_HUMAN	18724.84961	7.66	Transdução do Sinal
366	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	NDKA_HUMAN	17137.66992	5.83	Metabolismo / Apoptose
	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	NDKB_HUMAN	17286.93945	8.52	Metabolismo / Apoptose
	<i>Putative nucleoside diphosphate kinase</i>	NDK8_HUMAN	15518.98047	8.76	Metabolismo
368	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	PPIB_HUMAN	23727.5293	9.42	Metabolismo

369	<i>Galectin-3</i>	LEG3_HUMAN	26136.05078	8.57	Apoptose / Transdução do Sinal
370	<i>Galectin-3</i>	LEG3_HUMAN	26136.05078	8.57	Apoptose / Transdução do Sinal
373	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG_HUMAN	41765.78906	5.31	Estrutura
	<i>Beta-actin-like protein 3</i>	ACTBM_HUMAN	41988.83984	5.91	Estrutura
	<i>POTE ankyrin domain family member F</i>	POTEF_HUMAN	121366.6875	5.83	Estrutura
375	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>	K2C1_HUMAN	65999	8.15	Estrutura
379	<i>Reticulon-4-interacting protein 1, mitochondrial</i>	RT4I1_HUMAN	43561.58984	9.22	Redox
380	<i>Transmembrane protease, serine 11A</i>	TM11A_HUMAN	47538.46094	9.32	Proteólise